

CYNTHIA HERNANDES COSTA

**SNPs NA REGIÃO PROMOTORA 5'URR E INS/DEL DE 14pb NO EXON 8 DO
GENE *HLA-G* E SUA INFLUÊNCIA NA IMPLANTAÇÃO DO EMBRIÃO EM
CASAIS SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Dissertação de Mestrado

2011

CYNTHIA HERNANDES COSTA

**SNPs NA REGIÃO PROMOTORA 5'URR E INS/DEL DE 14pb NO EXON 8 DO
GENE *HLA-G* E SUA INFLUÊNCIA NA IMPLANTAÇÃO DO EMBRIÃO EM
CASAIS SUBMETIDOS A TRATAMENTO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria da Graça Bicalho

Curitiba

2011



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **CYNTHIA HERNANDES COSTA** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 21 de fevereiro de 2011

Professora Doutora Sueli Borelli
Departamento de Imunologia da UEM - Membro Titular

Professora Doutora Daniela Pavoni
Fiocruz - Membro Titular

Professora Doutora Maria da Graça Bicalho
Departamento de Genética da UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Professora Doutora Karin Braun-Prado
Departamento de Patologia da UFPR - Membro Titular

Visto:

Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Maria da Graça Bicalho, pelo apoio, tempo disponível e dedicação para a realização deste projeto como profissional, bem como pelos conselhos e compreensão nas horas que precisava de um ombro amigo.

À Prof^a Valeria M. S. Roxo, que apoiou e incentivou durante todo o trabalho, ajudando nos obstáculos encontrados.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade, especialmente a Fabiana Poerner, Izabel T. da Costa, Pryscilla F. Wowk e Sibelle B. Mattar pelos ensinamentos e apoio.

Ao Rafael G. Vargas pela paciência, dedicação, incentivo e ensinamentos durante o tempo que estive no laboratório.

Ao Dr. Alessandro Schuffer pela ajuda na seleção e abordagem dos casos pacientes, apoio e incentivo para a realização do trabalho.

À amiga Geórgia F. Gelmini por tudo que passamos, pelo apoio, incentivo, por acreditar em mim desde o começo, sem você teria sido muito mais difícil.

Aos colegas de turma, principalmente, Bruno Z. Piovezan, Larissa Guimarães, Mariane Madalozzo e Thaís J. Chaves pela amizade.

Aos meus amigos do Rio Grande de Sul, Aline K. de Oliveira, Eduardo A. Rigo e Mara Degasperi, que sempre acreditaram, incentivaram e apoiaram mesmo quando a distância me fazia ficar ausente.

À minha família pelo incentivo, apoio e confiança desde a seleção até o final do trabalho, que compreendeu os momentos de ausência e suportou os momentos difíceis em que a saudade apertava.

À Deus por me dar forças para seguir o caminho nas fraquezas através das pessoas que colocou ao meu redor.

Cada um a sua maneira foi determinante para que eu seguisse na caminhada e hoje possa com orgulho dizer que consegui chegar ao final de mais uma importante etapa da minha vida profissional.

“O valor de uma pessoa não está nas roupas que tem ou pelos bens que possui! O verdadeiro valor de um homem é o seu caráter, suas idéias e a nobreza dos seus ideais.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. TEMA	3
1.2. PROBLEMA	3
1.3. HIPÓTESE	4
1.4. OBJETIVOS	4
1.4.1. Objetivo Geral	4
1.4.2. Objetivos Específicos	4
1.5. JUSTIFICATIVA	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. REPRODUÇÃO HUMANA	5
2.1.1. Técnicas de reprodução assistida (TRA)	5
2.1.1.1. Fertilização in vitro (FIV)	6
2.1.1.2. Inseminação artificial (IA)	7
2.1.2. Causas de infertilidade com indicação de TRA	8
2.2. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA	10
2.3. ESTRUTURA DO GENE, PROTEÍNA HLA-G, ISOFORMAS E FUNÇÃO	12
2.4. REGULAÇÃO DO GENE HLA-G	15
2.5. POLIMORFISMOS DO GENE HLA-G	17
2.5.1. Polimorfismos da região codificadora	17
2.5.2. Polimorfismos da região reguladora	18
2.5.2.1. Variações na região 5'URR	19
2.5.2.2. Variações na região 3'UTR	19
2.6. INFLUÊNCIA DO HLA-G NA REPRODUÇÃO	20
3. RESULTADOS	24
CAPÍTULO I	24
Frequency analysis of 16 SNPs located in the HLA-G 5'URR region in couples undergoing to assisted reproduction	24
ABSTRAT	24

KEYWORDS	25
INTRODUCTION	25
MATERIALS AND METHODS	27
Case and Control Sample	27
<i>HLA-G</i> Genotyping	28
Statistics.....	29
RESULTS	29
Allelic, genotypic and haplotypic frequencies of 16 SNPs located in <i>HLA-G</i> 5' URR.	29
DISCUSSION.....	30
ACKNOWLEDGEMENTS	40
REFERENCES	40
CAPÍTULO II	43
HLA-G regulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment	43
CAPSULE	43
ABSTRAT	43
KEYWORDS	44
INTRODUCTION	44
MATERIALS AND METHODS	46
Subjects.....	46
<i>HLA-G</i> Genotyping	46
Statistical Analysis	47
RESULTS	48
DISCUSSION.....	49
ACKNOWLEDGEMENTS	51
REFERENCES	51
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICES	77
APÊNDICE I.....	78
APÊNDICE II.....	85
APÊNDICE III	87

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das etapas do procedimento de FIV.....	8
Figura 2: Localização do sistema HLA no cromossomo 6 (6p21.3).....	10
Figura 3: Estrutura e composição das isoformas do HLA-G.....	14
Figura 4: Polimorfismos da região 5'URR do gene HLA-G e os sítios de ligação dos fatores transcripcionais reguladores da expressão do gene	19

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Associação de alelos <i>HLA-G</i> com as formas sHLA-G e níveis solúveis de HLA de Classe I	15
Tabela II. Polimorfismos nucleotídicos definindo os alelos de <i>HLA-G</i>	18
Tabela III: Revisão dos estudos que investigam <i>HLA-G</i> e sua influência em diferentes etapas do processo reprodutivo	21

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	Região 3' não traduzida
5'URR	Região 5' reguladora não traduzida
β_2m	Beta-2 microglobulina
A	Adenina
AER	Abortamento espontâneo recorrente
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)
ART	<i>Assisted reproduction technologies</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i> (Ativador de fator de transcrição)
C	Citosina
cAMP	Adenina mono fosfato cíclica
CIITA	Transativador de classe II
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i> (Proteína ligante ao elemento de resposta ao cAMP)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
<i>EnhA</i>	Intensificador A
<i>EnhB</i>	Intensificador B
EXO I	Exonuclease I
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Guanina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HSE	<i>Heat shock element</i> (Elemento de choque térmico)
HSF1	<i>Heat shock factor 1</i> (Fator 1 de choque térmico)
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i> (Fator regulatório de interferon)
ISRE	<i>Interferon specific regulation element</i> (Elemento de resposta de interferon)
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin like receptor</i> (Receptores semelhantes a imunoglobulina das células <i>natural killer</i>)
LCR	<i>Locus control region</i> (Região controladora de locus)

LIGH	Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade
LIR	<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptors</i> (Receptores inibidores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas)
LTA	Linfotoxina α
LTB	Linfotoxina β
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator transcricional κ B
NK	<i>Natural killer</i> (Exterminadoras naturais)
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RA	Reprodução assistida
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase alcalina de camarão)
sHLA-G	HLA-G solúvel
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Alteração de uma única base)
T	Timina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TRA	Técnicas de reprodução assistida
U	Uracila
ZFX	<i>Zinger finger X</i> (Dedo de zinco X)

1. INTRODUÇÃO

O organismo humano tem um refinado sistema imunológico, que conta com a colaboração de importantes componentes celulares e moleculares, dentre os quais as proteínas antigênicas *Human Leukocyte Antigen* (HLA), codificadas por um sistema gênico que constitui o Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) humano, comumente referido como *Major Histocompatibility Complex* (MHC) e localizado no braço curto do cromossomo 6 (Região 6p21.3) (LAMM e OLAISEN, 1985).

Com o auxílio das proteínas HLA, as células têm a capacidade de participar do processo de reconhecimento de moléculas não próprias pelos linfócitos T, que uma vez ativados programam uma resposta de rejeição imunológica, independente da origem destas moléculas que pode ser viral, bacteriana ou até mesmo de um órgão transplantado (VAN DER VEN *et al.*, 2000).

No entanto, uma situação contraditória a este reconhecimento de moléculas não-próprias observa-se na relação materno-fetal, pois há a sobrevivência de um embrião semialogênico que herdou metade do componente genético de cada progenitor. Dessa forma, no que se refere aos genes *MHC*, o embrião apresenta um haplótipo paterno e outro materno, com todas as implicações decorrentes das diferenças genéticas da histocompatibilidade existentes entre ambos. Porém, em uma gravidez bem sucedida o embrião não é rejeitado pelo organismo materno durante seu desenvolvimento (AGRAWAL e PANDEY, 2003). Há de se considerar que o processo implantacional é altamente complexo e, resulta da habilidade do embrião de aderir e implantar-se num endométrio materno receptivo (FANCHIN *et al.*, 2007).

O sistema gênico *HLA* é composto por vários genes clássicos e não clássicos, de Classe I e de Classe II. Dentre os genes de Classe I não clássicos, o gene *HLA-G*, que codifica uma proteína solúvel com capacidade de atravessar a barreira placentária, e que também é expressa nessas células e no trofoblasto, tem sido referido como importante modulador da tolerância materno-fetal (KOVATS *et al.*, 1990; VAN DER VEN *et al.*, 2000; ISHITANI *et al.*, 2003).

São 46 alelos descritos para o gene *HLA-G* e 15 proteínas relacionadas (banco *HLA nomenclature*, <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>), um número relativamente reduzido de alelos, quando comparado com genes clássicos de Classe I. Além da variação genética observada em exons de *HLA-G*, tem sido descrita uma grande diversidade de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) em sua região promotora, o que poderia influenciar na

transcrição e nos níveis transcricionais de HLA-G e alterar significativamente sua função (revisado por HVIID, 2006).

Com base na possível influência dos polimorfismos observados na região reguladora e codificadora de *HLA-G*, diferentes grupos têm estudado a relação do genótipo *HLA-G* com o sucesso reprodutivo, com ênfase no abortamento espontâneo de repetição (AER) (PFEIFFER *et al.*, 2000; HVIID, CHRISTIANSEN, 2005; HVIID *et al.*, 2006; SILVA, 2009; VARGAS, 2011) e outras condições gestacionais, tais como, o sucesso na implantação de embriões manipulados em fertilização *in vitro* (FIV) (WARNER *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004a; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007), seleção do embrião a ser implantado (FUZZI *et al.*, 2002; NOCCI *et al.*, 2005; VERCAMMEN *et al.*, 2008; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010) e na pré-eclâmpsia (HVIID, CHRISTIANSEN, 2005; IVERSEN *et al.*, 2008).

Atualmente, técnicas de reprodução assistida (TRA) para o tratamento de infertilidade são alternativas adicionais para casais que desejam ter filhos (GOLDBERG *et al.*, 2007). As técnicas mais utilizadas são: a) FIV, que envolve a estimulação e coleta de óvulos, com posterior manipulação dos gametas femininos e masculinos, para a fecundação e o crescimento do embrião em cultura, sendo implantado entre o terceiro e o quinto dia após a fecundação; b) Inseminação artificial, que envolve a manipulação dos gametas masculinos, selecionando-os e introduzindo-os no útero materno, sem a manipulação do gameta feminino, sendo esta técnica utilizada em decorrência da infertilidade masculina (PAULI *et al.*, 2009).

A disponibilidade de diversos procedimentos para aumentar o sucesso implantacional, tais como a técnica da “ruptura da zona pelúcida” e diagnósticos genéticos pré-implantacionais mais acurados e estudos genéticos recentes, traz perspectivas de investigação de genes relevantes no processo reprodutivo, auxiliando no entendimento do sucesso implantacional *in vitro* e *in vivo* (PAULI *et al.*, 2009).

Em vários estudos o gene *HLA-G* tem sido referido como um importante modulador da tolerância materno-fetal (FANCHIN *et al.*, 2007) por sua interação com receptores presentes na membrana ou no citoplasma de células conhecidas como *natural killer* (NK) (NAVARRO *et al.*, 1999; VAN DER VEN *et al.*, 2000). Admite-se que o estado de tolerância presente na interface materno-fetal está diretamente relacionado com os níveis plasmáticos da proteína HLA-G expressos nesta interface, os quais dependem da regulação da expressão gênica de *HLA-G*. Além disso, formas solúveis de HLA-G (sHLA-G) no meio de cultura têm sido associadas a um melhor prognóstico implantacional, por resultarem numa maior taxa de clivagem das células embrionárias (FUZZI *et al.*, 2002; NOCCI *et al.*, 2005;

VERCAMMEN *et al.*, 2008; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010) e caracterizando o HLA-G como biomarcador candidato na seleção do melhor embrião a ser implantado.

1.1. TEMA

O desenvolvimento bem sucedido do embrião envolve a ação de inúmeros genes, expressos em locais e momentos específicos do processo implantacional. Dessa forma, a regulação da expressão gênica depende da ação de fatores de transcrição e de seus promotores específicos e também de outras etapas pós-transcricionais onde esta regulação também ocorre (tradução, processamento da proteína, transporte intra e inter celular).

1.2. PROBLEMA

Os SNPs presentes na região reguladora, na extremidade 5' (5'URR) de *HLA-G*, podem influenciar a ligação dos fatores transcricionais às seqüências sinalizadoras (elementos *cis*) presentes nessa região promotora. Outros SNPs e variações nucleotídicas localizados na região 3' não traduzida (3'UTR) poderiam alterar a estabilidade do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA). Adicionalmente, poderiam alterar a regulação da expressão de *HLA-G* pela via de regulação por meio de microRNAs, bloqueando a expressão gênica em nível pós-transcricional. Dessa forma, espera-se que variações nucleotídicas em regiões reguladoras que alterem a expressão gênica de *HLA-G*, resultando em diferenças nos níveis expressos das suas formas solúveis ou ligadas à membrana, possam influenciar no processo de aceitação fetal pelo organismo materno.

1.3. HIPÓTESE

A frequência genotípica e/ou alélica de um ou mais SNPs estudados estariam com distribuição distinta e, conseqüentemente, haveria uma alteração na expressão gênica de *HLA-G* nos casais submetidos ao tratamento de reprodução assistida, quando comparados com casais com sucesso reprodutivo sem auxílio de tratamento.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo Geral

Avaliar a possível influência de SNPs de regiões não codificadoras (5'URR e 3'UTR) do gene *HLA-G* na implantação do embrião em casais com necessidade de TRA.

1.4.2. Objetivos Específicos

Investigar SNPs de regiões não codificadoras (5'URR e 3'UTR) do gene *HLA-G* em casais em TRA e casais controle.

Comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos SNPs da região 5'URR de *HLA-G* em casais em TRA e casais controle.

Comparar as frequências alélicas e genotípicas das variantes do polimorfismo ins/del de 14 pb do exon 8 de *HLA-G* em casais em TRA e casais controle.

Analisar a associação entre SNPs e do polimorfismo de ins/del de 14pb do gene *HLA-G* em casais com necessidade de técnicas de reprodução assistida e o sucesso do procedimento implantacional.

1.5. JUSTIFICATIVA

Estudo pioneiro na região sul do Brasil, investigando associação entre SNPs situados em regiões reguladoras de *HLA-G* e o sucesso gestacional em casais submetidos a procedimentos de reprodução assistida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. REPRODUÇÃO HUMANA

A taxa de infertilidade humana tem aumentado nas últimas décadas, e, em paralelo a este aumento, a medicina reprodutiva iniciou o desenvolvimento de TRA (revisado por VELA *et al.*, 2009), objetivando, à época da implantação das técnicas, possibilitar a gestação em mulheres com obstruções tubárias (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Atualmente, as TRA são indicadas para os casais que apresentam qualquer causa de infertilidade, decorrente de fatores femininos ou masculinos (revisado por VELA *et al.*, 2009).

2.1.1. Técnicas de reprodução assistida (TRA)

O marco na área da medicina reprodutiva, que foca o desenvolvimento destas técnicas, ocorreu em 1978, com o nascimento da primeira criança pela técnica de FIV (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Nas décadas seguintes, outras técnicas foram introduzidas, incluindo transferência intrafalopiana do zigoto e transferência intrafalopiana de gameta, porém, por serem mais invasivas, houve uma preferência pela FIV, que apresenta altas taxas de sucesso e uma menor invasão (LEVRAN *et al.*, 2002; ASLAN *et al.*, 2005), sendo ao lado

da inseminação artificial (IA) a técnica mais utilizada, atualmente, em centros de reprodução assistida.

2.1.1.1. Fertilização in vitro (FIV)

A FIV é indicada para o tratamento em casais nos quais a infertilidade é de origem feminina e/ou masculina, sendo responsável por aproximadamente 1 nascimento em 50 na Suécia, 1 em 60 na Austrália e 1 em 100 nos Estados Unidos (revisado por PAULI *et al.*, 2009; VELA *et al.*, 2009). No Brasil não estão disponíveis dados epidemiológicos quanto à taxa de nascimentos decorrentes de FIV. Esta técnica consiste dos seguintes passos (Figura 1):

- Estimulação de múltiplos folículos – para a produção de um coorte (do latim *Cohors* ou subdivisões) de folículos uniformes, com desenvolvimento e maturação controlados permitindo a maturação de múltiplos oócitos (PAULI *et al.*, 2009).

- Captura dos oócitos – ocorria por laparoscopia, procedimento cirúrgico invasivo, feito com efeito anestésico, porém com o avanço do ultra-som, o folículo pode ser identificado e a retirada do oócito ocorre através da aspiração a vácuo, procedimento menos invasivo (LEVENS *et al.*, 2009).

- Captura dos espermatozóides – sem auxílio de estimulação da produção prévia esta captura ocorre por masturbação na maioria dos tratamentos. Porém em casos de azoospermia, realiza-se a captura dos espermatozóides por aspiração (punção) epididimal ou extração (procedimento cirúrgico) testicular (revisado por PAULI *et al.*, 2009; VELA *et al.*, 2009).

- Fecundação do oócito – a fertilização pode ocorrer pela incubação do oócito com milhares de espermatozóides, onde o gameta masculino mais apto penetra na zona pelúcida do oócito; ou pela inserção de espermatozóides no citoplasma do oócito, por meio de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Em casos de infertilidade masculina mais severa, o gameta masculino, pré-selecionado, penetra a zona pelúcida com auxílio da injeção (VEECK, 1999).

- Seleção e transferência do embrião – a definição do embrião a ser selecionado ocorre pela análise morfológica (taxa de clivagem, simetria do blastômero, aparência

citoplasmática, extensão da fragmentação e estado nuclear do blastômero) (RIENZI *et al.*, 2005), pelo diagnóstico pré-implantacional, que avalia a presença de alterações citogenéticas, principalmente aneuploidias e rearranjos cromossômicos (KULIEV *et al.*, 2008), e mais recentemente, pela quantificação da proteína de HLA-G solúvel (sHLA-G). Estudos recentes sobre a presença da proteína HLA-G no sobrenadante da cultura, têm sido sugestivos do seu potencial papel como biomarcador no prognóstico implantacional (BORGATTI *et al.*, 2008; WARNER *et al.*, 2008). O número de embriões a serem implantados é determinado, principalmente, pela idade materna (MILKI *et al.*, 2003). A transferência para o útero materno, entre o terceiro e o quinto dia após a fecundação, realiza-se via cateter transcervical flexível ou para as trompas de Falópio por laparoscopia. A implantação na parede uterina ocorre aproximadamente no sexto dia, na fase de blastocisto (cerca de 64 células), para a placentação do trofoblasto e desenvolvimento natural do embrião durante a gestação no útero materno (BLAKE *et al.*, 2007).

2.1.1.2. Inseminação artificial (IA)

A IA é indicada em casos que a infertilidade do casal é devido a um fator masculino, fator desconhecido ou ainda em casos de endometriose em nível mínimo ou moderado. A técnica pode ser com ou sem o auxílio da estimulação ovariana (BENSNDORP *et al.*, 2007). As etapas deste procedimento são:

- Preparação do sêmen – o plasma seminal é removido por centrifugação dos espermatozóides através de meio de cultura ou por gradiente de densidade seguido de re-suspensão em meio de cultura adequado. A finalidade desta remoção é evitar as contrações uterinas induzidas por prostaglandinas (BOOMSMA *et al.*, 2007).

- Inseminação – pode ocorrer em diferentes etapas e diversas vezes durante o mesmo período de ovulação. No entanto é comumente realizada entre 32 a 36 horas após a estimulação da ovulação, pois apesar do momento da inseminação durante a ovulação ser fundamental para uma maior taxa de sucesso, não há a caracterização de um momento ideal (RAGNI *et al.*, 2004). O depósito da suspensão dos espermatozóides por um cateter pequeno e flexível, em geral sem auxílio de imagem, pode ser no colo do útero, na trompa de Falópio, através do peritônio, sendo utilizado um maior volume do inseminado quando o procedimento

ocorre na trompa, pois se acredita que uma parte do volume pode permanecer na cavidade peritoniana (KAHN *et al.*, 1992).

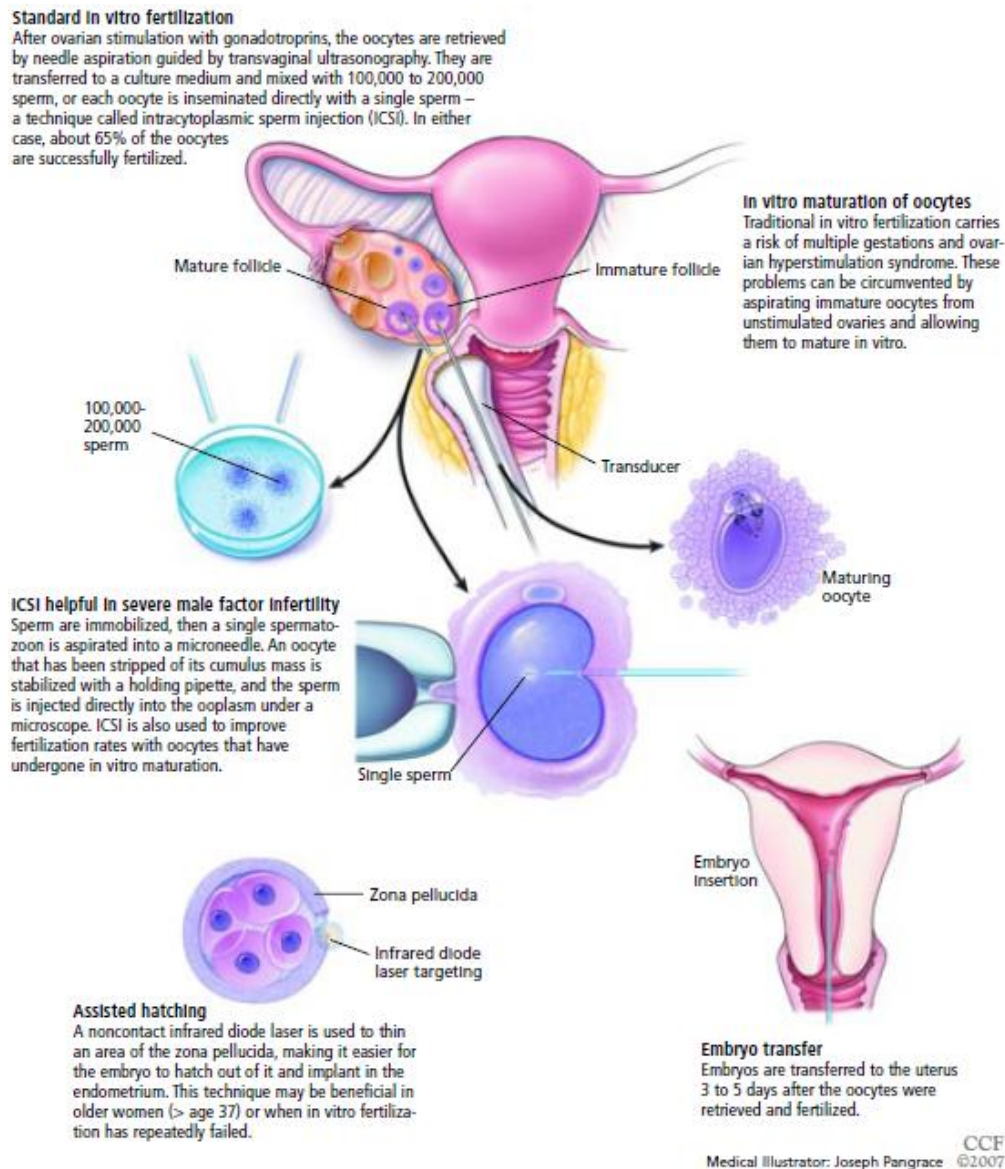


Figura 1: Representação das etapas do procedimento de FIV (Fonte: Goldberg et al., 2007).

2.1.2. Causas de infertilidade com indicação de TRA

Endometriose – alterações no endométrio ou presença de tecido endometrial fora de sua localização habitual, fora do útero. Acomete cerca de 25 a 50% das mulheres inférteis

e 5% das mulheres férteis (VERKAUF, 1987). O uso da FIV como tratamento para essa causa de infertilidade é recomendado para pacientes que apresentam doenças tubárias ou não responderam ao tratamento cirúrgico de remoção do tecido do endométrio, ou quando da infertilidade masculina (KENNEDY *et al.*, 2005). A infertilidade resultante da endometriose pode ocorrer pela distorção das tubas uterinas, dificultando ou impedindo a captação do óvulo adequadamente, pela interferência no desenvolvimento do óvulo ou na fase embrionária inicial, e pelo endométrio não tão receptivo ao embrião (revisado por NAVARRO *et al.*, 2003).

Infertilidade por fator tubário – lesões dificultam ou impossibilitam a passagem de espermatozóides, resultando na não fecundação do gameta feminino. O tratamento por FIV é indicado em bloqueio tubário, adesão pélvica severa ou em retirada das trompas bilateralmente (revisado por VELA *et al.*, 2009).

Ausência de ovulação – pacientes com clínica de hipogonadismo hipotalâmico e síndrome do ovário policístico são os casos indicados para FIV (THESSALONIKI, 2008). Neste grupo clínico a gravidez múltipla é mais rara, porém a estimulação ovariana é complicada, já que as pacientes podem sair de uma clínica de baixa resposta a estimulação para uma hiperestimulação ovariana (revisado por VELA *et al.*, 2009).

Infertilidade imunológica – há no soro materno anticorpos anti-espermatozóides, que podem alterar sua mobilidade e interação com a mucosa cervical, impedindo a fertilização do oócito tanto *in vivo* como *in vitro* (BRONSON, 1990). Para contornar esta situação, técnicas como a remoção dos anticorpos ligados ao espermatozóide e a facilitação da fertilização pela inseminação por ICSI são adotadas (LOMBARDO *et al.*, 2004).

Fator masculino – a infertilidade masculina responde por aproximadamente 20% da busca ao tratamento por TRA. Acredita-se que a mesma possa estar presente em cerca de 30 a 40% dos casais inférteis que recorrem à TRA, segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva. A abordagem para tratamento desta causa de infertilidade depende da quantidade e qualidade dos espermatozóides. Em casos leve a moderado de oligospermia (baixa contagem de espermatozóides no ejaculado) e/ou astenospermia (baixa motilidade do espermatozóide) a IA pode ser adotada, mas em casos severo a indicação é ICSI.

Infertilidade sem causa conhecida – as causas não são definidas para aproximadamente 30% da população infértil. As opções terapêuticas são controversas, não tendo sido demonstrado diferenças entre os tratamentos de FIV, IA com ou sem estimulação ovariana, transferência intrafalopiana do gameta e administração de citrato de clomifeno

(substância administrada em caso de infertilidade feminina, estimula a ovulação) (PANDIAN *et al.*, 2005).

2.2. COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA

Genes altamente polimórficos e outros monomórficos estão localizados no braço curto do cromossomo 6, 6p21.3, em região denominada por MHC (LAMM e OLAISEN, 1985). Em humanos, o MHC é referido como HLA, ou Sistema Gênico *HLA*.

Os genes *HLA* são responsáveis pela síntese de produtos protéicos que apresentam um papel importante no reconhecimento de moléculas próprias e não próprias, seja durante a educação tímica dos linfócitos T e/ou no curso de infecções e transplantes de tecidos sólidos, o que freqüentemente resulta em reação de reconhecimento imune que permite a neutralização do agente patogênico ou a rejeição, no caso dos órgãos e tecidos transplantados (VAN DER VEN *et al.*, 2000) (Figura 2).

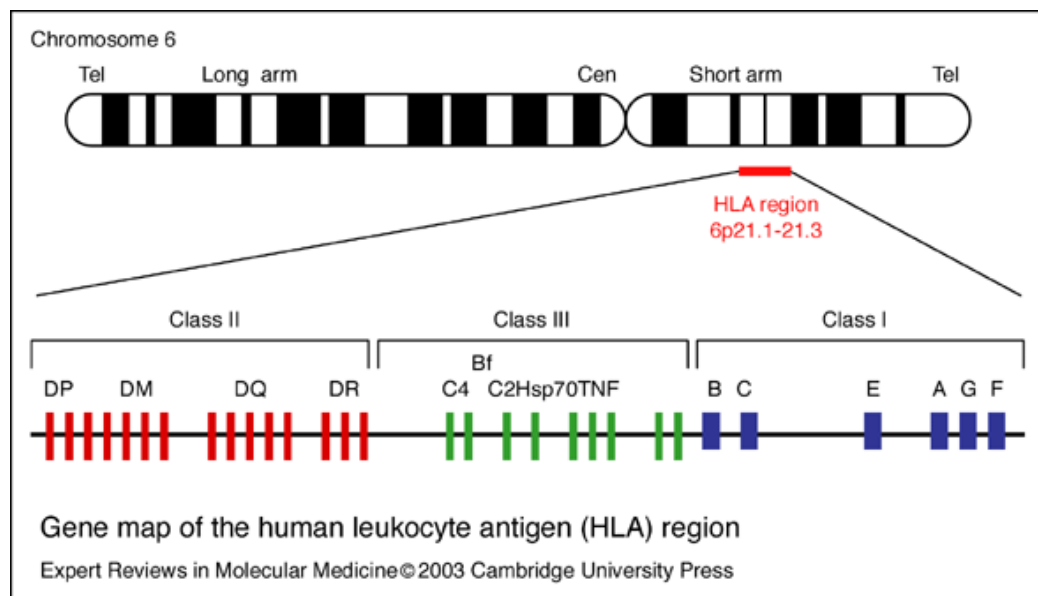


Figura 2: Localização do sistema HLA no cromossomo 6 (6p21.3). Fonte: MEHRA e KAUR, 2003

Mais recentemente tem sido enfatizada a participação de proteínas HLA de Classe I com outros mecanismos de imunovigilância, através da interação com receptores relacionados presentes em células NK.

O Sistema Gênico *HLA* codifica proteínas com propriedades imunológicas similares, mas estruturalmente diferentes, e classificam-se em:

- Genes HLA de Classe I: codificam proteínas de classe I, presentes em todas as nossas células, tais como, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* referidas como moléculas clássicas ou Ia. Os genes *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* codificam produtos referidos como não-clássicos ou Ib. Esses produtos moleculares, constituídos por um polipeptídeo α , que contém três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), compõem uma estrutura tridimensional associando-se com um outro polipeptídeo, beta-2 microglobulina (β_2m), codificado por gene de mesmo nome situado no cromossomo 15. As proteínas HLA de Classe I interagem com linfócitos T citotóxicos ou TCD8⁺ (TROWSDALE, 1987).

- Genes HLA de Classe II: *HLA-DM*, *HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DZ/DO* e *HLA-DP* codificam proteínas de classe II de mesmo nome, presentes na superfície de linfócitos T, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APC), tais como macrófagos e células dendríticas. Esses produtos protéicos são heterodímeros constituídos por um polipeptídeo α , com dois domínios ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), e um peptídeo β , também com dois domínios ($\beta 1$ e $\beta 2$) (TROWSDALE, 1987). As proteínas HLA de Classe II interagem com linfócitos T auxiliares ou TCD4⁺, apresentando peptídeos exógenos de origem extracelular.

- A região gênica conhecida como de classe III, contém uma variedade de genes, em sua maioria relacionados com funções imunes, dentre os quais genes que codificam citocinas como a linfotoxina α (*LTA*), fator de necrose tumoral (*TNF*) e linfotoxina β (*LTB*), bem como genes que codificam proteínas do sistema complemento das vias clássicas, que interagem com o complexo antígeno-anticorpo para promover a lise celular na resposta humoral, e genes que codificam proteínas da via alternativa do complemento (*C2*, *BF* e *C4B*) (CARROLL *et al.*, 1985), entre outros.

2.3. ESTRUTURA DO GENE, PROTEÍNA HLA-G, ISOFORMAS E FUNÇÃO

Geraghty *et al.*, em 1987, caracterizaram por clonagem uma sequência genômica não MHC de Classe Ia (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) localizada num fragmento de restrição de 6.0 kilobases, razão pela qual foi referida inicialmente como *HLA-6.0*. Posteriormente foi designada *HLA-G* por apresentar organização gênica semelhante aos genes *HLA* classe I clássicos: 8 exons, 7 introns e 1 região 3'UTR. Entretanto, observou-se no sexto exon de *HLA-G* um códon de término de tradução, que resultava numa proteína com um segmento citoplasmático com apenas 6 aminoácidos, contrastando com as outras proteínas HLA de Classe I clássicas, que apresentam aproximadamente 30 aminoácidos nessa região altamente conservada da proteína.

Ellis *et al.*, 1990, classificaram o *HLA-G* como um gene que codifica moléculas de classe I não clássicas. Seu importante papel na interação materno-fetal, através da ligação aos receptores inibidores das células NK, do tipo *Killer cell immunoglobulin like receptor* (KIR), especificamente ao receptor KIR2DL4, receptores inibidores leucocitários semelhantes às imunoglobulinas (LIR)-1 e LIR-2, ou interagindo com a molécula HLA-E, que se liga ao receptor CD94/NKG2, foi descrito posteriormente por Navarro *et al.*, 1999.

Os exons 2, 3 e 4 do gene *HLA-G* codificam os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente, sendo os 2 primeiros, aqueles que definem a fenda para ligação do peptídeo, enquanto que no domínio $\alpha 3$ situam-se os epítomos ligantes para receptores LIR-1 e LIR-2. Tais receptores são funcionalmente relacionados aos receptores inibidores KIR de células NK. A ligação de LIRs ou KIRs nas moléculas de classe I resulta em sinais inibidores da ativação de células NK. Esta possível função é distinta daquela exercida pela região $\alpha 3$ nas moléculas de classe I clássicas, que é interagir com a β_2m (LEE *et al.*, 1995; DIEHL *et al.*, 1996). À semelhança dos antígenos MHC de Classe I clássicos nos quais certos resíduos estão em posições conservadas e situam-se em posições estratégicas para interação com linfócitos T CD8⁺, essas regiões conservadas também são observadas na proteína HLA-G e HLA-E (GAO *et al.*, 1997).

Bjorkman *et al.*, em 1987, definiram 15 aminoácidos que poderiam interagir diretamente com o receptor de célula T CD8⁺, por estarem expostos no domínio de ligação do antígeno. Destes, 2 são altamente variáveis, 6 moderadamente variáveis e 7 conservados. Dentre esses últimos, 6 são idênticos entre *HLA-A2* e *HLA-G*, o que sugere que HLA-G possa

participar de mecanismos efetores da resposta imune adaptativa, interagindo com linfócitos T citotóxicos. A ausência da molécula HLA-A, para interagir com os receptores de células T no trofoblasto e a presença de moléculas HLA-G, levam a hipotetizar que a proteína HLA-G participe de outra via de imunovigilância mediada por células NK, através da interação com receptores KIR4DL4 expressos na membrana das células NK (KOVATS *et al.*, 1990), o que resultaria na tolerância fetal pelo organismo materno.

Além do mecanismo de prevenção da lise por células NK CD56⁺, sugere-se que a proteína HLA-G possa induzir células T $\gamma\delta$ a suprimir a rejeição do feto via células T CD8⁺ citotóxicas ou, ainda, por efeito supressor da proteína solúvel de HLA-G nas células T (DIEHL *et al.*, 1996).

O transcrito do mRNA de HLA-G pode resultar em diferentes isoformas através de processamento alternativo (Figura 3). Algumas dessas isoformas são ligadas a membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) enquanto outras são isoformas solúveis (HLA-G5, G6 e G7) (LE BOUTEILLER e BLASCHITZ, 1999). As formas solúveis resultam da manutenção do íntron 2 ou 4 durante o processamento do mRNA. O transcrito maduro resultante possui um códon de término de tradução prematuro (UGA), que codifica uma proteína sem a região responsável pela ligação da molécula à membrana (BLASCHITZ *et al.*, 2005). Estas isoformas apresentam diferentes níveis de expressão, os transcritos relacionados a HLA-G3, HLA-G4 e HLA-G7 são raros nas placentas. HLA-G1 e G2/G6 localizam-se na interface entre o trofoblasto e a decídua; enquanto HLA-G5 está presente em várias sub-populações de células do trofoblasto, a proteína pode estar ou não associado com a cadeia leve da β_2m (MORALES *et al.*, 2007).

Moléculas sHLA-G são encontradas no sangue periférico de homens e mulheres saudáveis, no sangue do cordão umbilical e no fluido amniótico, sendo consideradas como mediadoras da tolerância imunológica e principalmente da tolerância materno-fetal (REBMANN *et al.*, 2001).

A forma G1 solúvel, resultado da inclusão do íntron 4, é conhecida como G5, e foi estudada por Rebmann *et al.*, em 1999, como a principal responsável pelas trocas metabólicas entre o organismo materno e o fetal, uma vez que tem sido observado o aumento dos níveis séricos dessa isoforma durante a gestação. De acordo com Fuzzi *et al.*, em 2002, a molécula HLA-G5 pode ser secretada por células embrionárias e não somente por células maternas. Como resultados de seus estudos pode-se observar a presença dessa isoforma de HLA-G em cultura de embriões *in vitro*, sendo que conclusões similares foram obtidas por Kotze *et al.* e Rebmann *et al.*, conforme consta em literatura publicada em 2010. Por outro lado Van Lierop

et al., em 2002, não detectaram a presença de sHLA-G em cultura de embriões antes da implantação, o que se contrapõe aos achados de Fuzzi *et al.*, 2002.

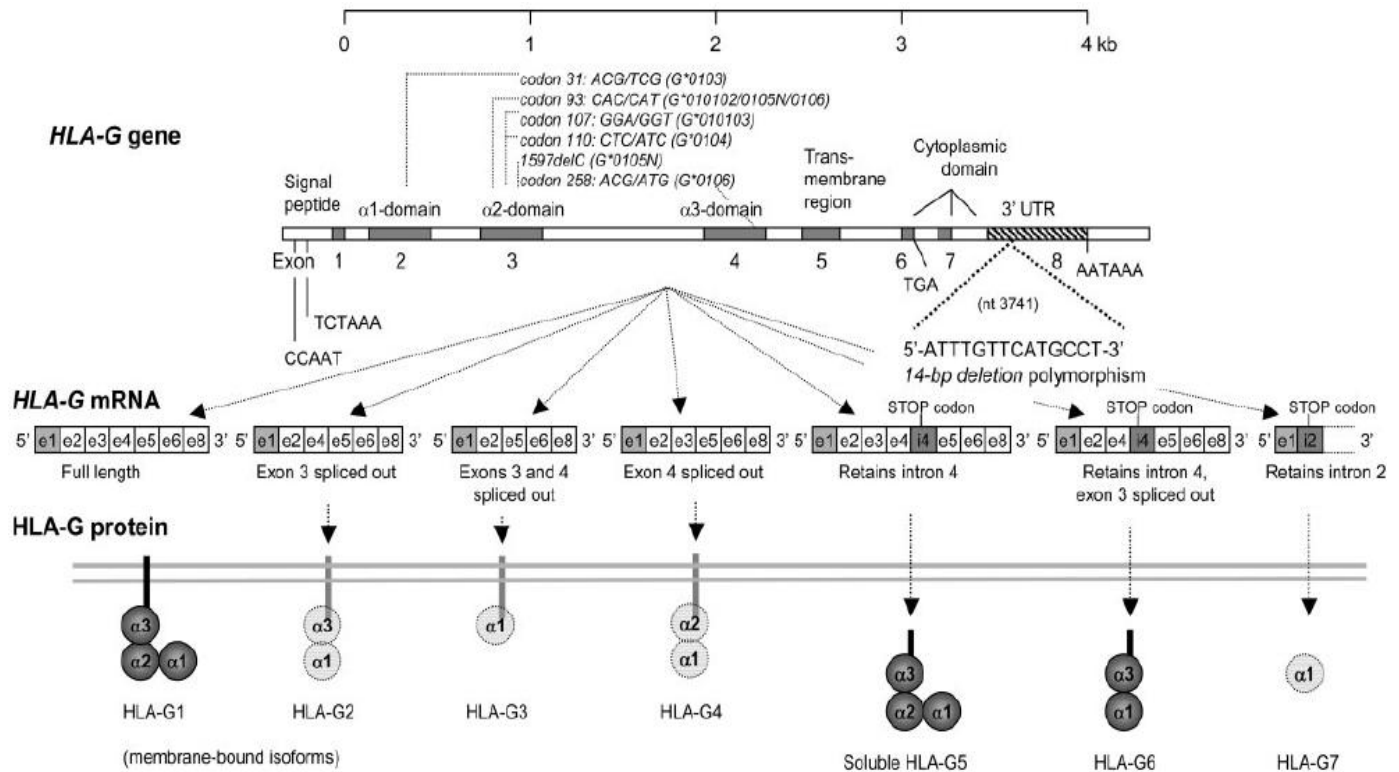


Figura 3: Estrutura e composição das isoformas do HLA-G. Fonte: HVIID et al., 2006.

Os níveis plasmáticos do sHLA-G são diretamente influenciados pelos alelos do gene *HLA-G*. Segundo Rebmann *et al.*, em 2001, os indivíduos portadores do grupo alélico *HLA-A11*, apresentam baixos níveis de sHLA-G, o que pode também ser inferido pelo desequilíbrio de ligação positivo entre alelos dos genes *HLA-A* e *HLA-G*. Da mesma forma, baixos níveis de sHLA-G têm sido observados na presença dos alelos *HLA-G*01:01:03* e do alelo *HLA-G*01:05N*. O alelo *G*01:04:01* tem sido relacionado a altos níveis séricos de sHLA-G, assim como o *G*0101g*, enquanto níveis intermediários tem sido associados aos alelos *G*01:01:08* e *G*01:04b*. Hviid *et al.*, em 2003, relacionaram os alelos baixo secretores descritos por Rebmann *et al.*, em 2001, com a presença dos 14pb (ins14pb) no exon 8 do *HLA-G*, enquanto nos alelos alto secretores esta sequência (del14pb) estava deletada.

A concentração plasmática de sHLA-G foi avaliada por teste de Elisa, em famílias informativas, tipificadas para *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e *HLA-G*, onde foi possível realizar também análises de segregação de haplótipos HLA, bem como para os alelos *HLA-G* referidos como alto e baixo secretores (REBMANN *et al.*, 2001).

Tabela I: Associação de alelos *HLA-G* com as formas sHLA-G e níveis solúveis de HLA de Classe I.
Association of HLA-G alleles with sHLA-G and sHLA-I levels

HLA-G*	n ¹	sHLA-G (ng/ml)				sHLA-I (ng/ml)			
		mean	SEM	t-test	P _c	mean	SEM	t-test	P _c
01011	66	27.0	2.1			573.0	53.4		
01012	34	28.4	3.2			659.4	93.4		
01013	17	8.1	1.7	<0.0001	<0.001	666.0	106.9		
01018	6	26.6	3.9			733.2	252.6		
0101g	1	49.9				1082.0			
01031	7	31.3	6.3			733.0	191.2		
01041	14	42.5	4.6	0.0004	0.0036	1345.0	195.0	<0.0001	<0.001
0104b	4	29.5	7.9			831.3	145.0		
0105N	7	8.2	3.2	0.0013	0.012	813.6	271.1		

¹ Frequencies of individual HLA-G alleles from homozygous or heterozygous probands. None of the individuals tested was homozygous for the HLA-G*01013, G*0101g, G*01031, G*01041, G*0104b, and G*0105N alleles, respectively.

Fonte: Rebmann *et al.*, 2001

2.4. REGULAÇÃO DO GENE *HLA-G*

Os genes MHC classe I e II apresentam similaridades em suas regiões promotoras. Linhagens celulares de pacientes deficientes em moléculas MHC classe II demonstraram reduzida expressão das moléculas de classe I, sugerindo a regulação dos genes desta classe por fatores transcripcionais que controlam expressão dos genes MHC de classe II (SABATIER *et al.*, 1996). O fator transcricional ativador de classe II (CIITA) apresentou atividade de ativação transcricional nos promotores de classe I através da sua ligação a seqüências do *sítio* α , que também pode ligar proteínas da família dos fatores transcripcionais ativador de fator transcricional (ATF)/ proteína ligante ao elemento da adenina mono fosfato cíclica (AMPC) (CREB) (GOBIN *et al.*, 1997a). Esta seqüência do promotor de MHC classe I é homóloga ao *box* X2 dos promotores gênicos de MHC classe II (MORENO *et al.*, 1995).

Existe uma seqüência homóloga ao *box* X2 a 5' do *sítio* α no promotor de MHC classe I, e seqüências homólogas ao *box* W/S, presente no promotor de MHC classe II. O *Box* CCAAT invertido, presente nas seqüências *enhB* do promotor MHC classe I, é idêntico ao *box* Y do promotor de classe II (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a). O complexo ATF/CREB-*sítio* α e a seqüência 3' flanqueadora do *interferon specific regulation element* (ISRE) são cruciais para os elementos regulatórios a 5' no promotor do MHC classe I (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998a).

Os elementos regulatórios conservados no promotor dos genes MHC de classe I clássicos, intensificador A (*enhA*), ISRE, o sítio α e intensificador B (*enhB*) (BLANCHET *et al.*, 1992), não se apresentam conservados nas regiões reguladoras dos genes MHC classe I não-clássicos, o que poderia modificar a afinidade pelos fatores transcrpcionais e suas subunidades (VAN DEN ELSEN *et al.*, 1998b). No promotor de *HLA-G*, o *enhA* apresenta apenas as seqüências iniciais na extremidade 5' e o restante deletado, assim como toda a seqüência ISRE (GERAGHTY *et al.*, 1987). O sítio α e o *box Y* também divergem da seqüência apresentada nos promotores dos genes clássicos (BOSS, 1997; GOBIN *et al.*, 1998) e há uma região a 5' do exon 1 (1,1kb) que direciona a transcrição específica de *HLA-G*, e por essa razão investigada como candidata à regulação tecido específica da expressão de *HLA-G* (SCHMIDT *et al.*, 1993).

Como consequência da seqüência deletada no *enhA*, a expressão de *HLA-G* pode apresentar propriedades de ligação alteradas ao se ligar apenas á subunidade p50 (GOBIN *et al.*, 1997b), um dos cinco membros da família do fator transcricional kapa-B (NF- κ B) (p65,p52, c-Rel e RelB), que interage em dois sítios de ligação na seqüência completa do *enhA* (THANOS E MANIATIS, 1995).

A seqüência ISRE possibilita a regulação da expressão basal ou induzida de genes MHC de Classe I e II pela interação com o interferon gama (IFN- γ) (GOES *et al.*, 1995). Isso não acontece no promotor de *HLA-G*, onde alterações nas seqüências do módulo S-X-Y, determinam a não resposta ao IFN- γ , bem como ao CIITA.

O fator transcricional fator regulatório de interferon (IRF-1) atua como um ativador de transcrição de *HLA-G* (HOBART *et al.*, 1997) e tem função antagônica a IRF-2 e ICSBP (NELSON *et al.*, 1993). Por apresentar afinidade também pelo ISRE sugere-se uma possível regulação da expressão gênica de *HLA-G* através de outros elementos regulatórios, tais como sítios adicionais de resposta a IRF-1 e 2 e possíveis sítios de ligação para proteínas com módulos transativadores tipo “dedo de zinco”. No entanto, *HLA-G* não é regulado por *zinger finger X* (ZFX) (GOBIN *et al.*, 1998). A ativação da expressão induzida pelo IFN- β pode estar associada a um elemento funcional localizado a -746 pares de bases do códon ATG inicial, no promotor do gene *HLA-G* (LEFEBVRE *et al.*, 1999).

O perfil de metilação pode ser uma forma de silenciamento dos genes MHC classe I clássicos no trofoblasto, porém não há evidências de dinucleotídeos metilados nas ilhas CpG nos promotores dos genes de classe I clássicos presentes, mas não expressos, no trofoblasto *in vivo* (LE BOUTEILLER *et al.*, 1996).

Pela ausência de evidências de regulação tecido específica na região promotora de 1500 pares de bases do gene *HLA-G*, sugere-se que os fatores reguladores da expressão gênica de *HLA-G* no trofoblasto possam ser fatores imunoreguladores secretados pela placenta. A interleucina (IL)-10 tem sido estudada como uma candidata a imunoregulação, sendo responsável pelo controle da expressão de *HLA-G*. Nesse contexto, IL-10 recrutaria proteínas específicas para a regulação do processo fisiológico da tolerância imune durante a gestação, atuando como *enhancer* da expressão de *HLA-G* (MOREAU *et al.*, 1999). Outras interleucinas, como IL-2, IL-4, IL-13, INF- γ e TNF- α não induziriam a expressão de *HLA-G* nas células NK (BENSUSSAN *et al.*, 1995).

Na região promotora do *HLA-G*, localiza-se entre as posições – 486 e -477, seqüências reguladoras em *cis* (*Heat shock element* (HSE)) que atuam como sítio de ligação para o fator transcricional *Heat shock factor 1* (HSF1) (IMBRAIM *et al.*, 2000). A seqüência HSE constitui-se de repetições pentanucleotídicas (nGAAn), arranjadas em orientação alternativa, e estão presentes na região promotora de genes que codificam para proteínas de choque térmico (YAMAMOTO *et al.*, 2005). Estes elementos não estão presentes nas regiões promotoras de *HLA-A*, *-B*, *-E* e *-F* (IMBRAIM *et al.*, 2000; Rizzo *et al.*, 2009a).

2.5. POLIMORFISMOS DO GENE HLA-G

2.5.1. Polimorfismos da região codificadora

Até a presente data estão registrados no IMGT/HLA, 46 alelos, 15 proteínas e 2 alelos nulos de *HLA-G*. Da mesma forma, o *Genbank*, banco de dados *on line*, reporta variações nucleotídicas na região codificadora do gene *HLA-G*, sendo sinônimas, não sinônimas e com a troca da matriz de leitura.

A tabela II traz a relação de alguns alelos já descritos de *HLA-G* entre eles o alelo *HLA-G*01:05N* que apresenta uma deleção de C no códon 130 do exon 3, resultando em alteração na matriz de leitura (VAN DER VEN *et al.*, 1994), e na produção de uma molécula HLA-G1 truncada. Indivíduos homozigotos para este alelo apresentam reprodução normal,

evidenciando que o produto desse gene, talvez não seja essencial para a sobrevivência (OBER *et al.*, 1998). No codon 110 do exon 3, ocorre também uma substituição não sinônima (alteração de aminoácido) que resulta no alelo *G*01:04* (revisado por HVIID, 2006), enquanto no códon 31 do exon 2 o alelo *G*01:03* é caracterizado por uma substituição silenciosa de base, quando comparado aos alelos *G*01:01* e *G*01:02* (troca de base no códon 54 no exon 2), porém não se descarta um possível códon de parada à 5' desta variação nucleotídica (REBMANN *et al.*, 2001). Outra substituição de aminoácido resulta na alteração no códon 258 do exon 4, originando o alelo *G*01:06* (revisado por HVIID, 2006).

Tabela II. Polimorfismos nucleotídicos definindo os alelos de *HLA-G*.

<i>HLA-G</i> alleles	5'UTR/ promotor*	Exon 2							Exon 3				Exon 4				3'UTR* (nt 3741)
		-725	-201	31	35	54	57	69	93	100	107	110	130	188	236	241	258
<i>G*010101</i>	C or G	G	ACG	CGG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGC	GGA	CTC	CTG	CAC	GCA	TTC	ACG	-
<i>G*010102</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	---	+14 bp
<i>G*010103</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	--T	---	---	---	---	-C-	---	+14 bp
<i>G*010104</i>	C	G	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	nd	nd	nd	nd	nd
<i>G*010105</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*010106</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	nd
<i>G*010107</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	---	--T	---	---	---	---	---	---	nd
<i>G*010108</i>	C	G	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-
<i>G*0102</i>	nd	nd	---	---	-G-	---	---	---	---	---	---	---	---	--C	---	---	nd
<i>G*0103</i>	C (or T)	G	<i>T</i> --	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*010401</i>	C	A	---	---	---	--A	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	-
<i>G*010402</i>	nd	nd	---	---	---	--C	---	---	---	---	A--	---	--T	---	---	---	nd
<i>G*010403</i>	nd	nd	---	---	---	---	---	---	---	---	A--	---	---	---	---	---	-
<i>G*0105N</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	•TG	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*0106</i>	C	A	---	---	---	--A	---	--T	---	---	---	---	---	---	---	-T-	+14 bp
<i>G*0101g†</i>	nd	nd	---	--A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp
<i>G*G3d5†</i>	nd	nd	---	---	---	--A	---	--T	--T	---	---	---	---	nd	nd	---	+14 bp

Nd - não definido. Fonte: HVIID *et al.*, 2006.

2.5.2. Polimorfismos da região reguladora

Polimorfismos importantes também estão presentes nas regiões 5'UTR e 3'UTR, os quais têm sido associados com a regulação gênica e níveis de expressão de *HLA-G* (HVIID *et al.*, 2006).

2.5.2.1. Variações na região 5'URR

Na posição -725 observa-se a troca de bases nucleotídicas, C por G ou por T (OBER *et al.*, 2003). A troca por G já foi relacionada à regulação da expressão de *HLA-G*, uma vez que existe na posição -726 uma C. Na posição -201, observa-se a troca de G por A nos alelos *HLA-G*01:01:02*, *G*01:01:03*, *G*01:04*, *G*01:05N* e *G*01:06*. Nesta região localiza-se o *enh A*, onde se liga o fator transcrricional NF- κ B2, especificamente no sítio κ B2 (HVIID *et al.*, 1999). Na figura 3 pode-se observar a posição destes e de outros SNPs da região 5'URR e os sítios de regulação da expressão do *HLA-G*.

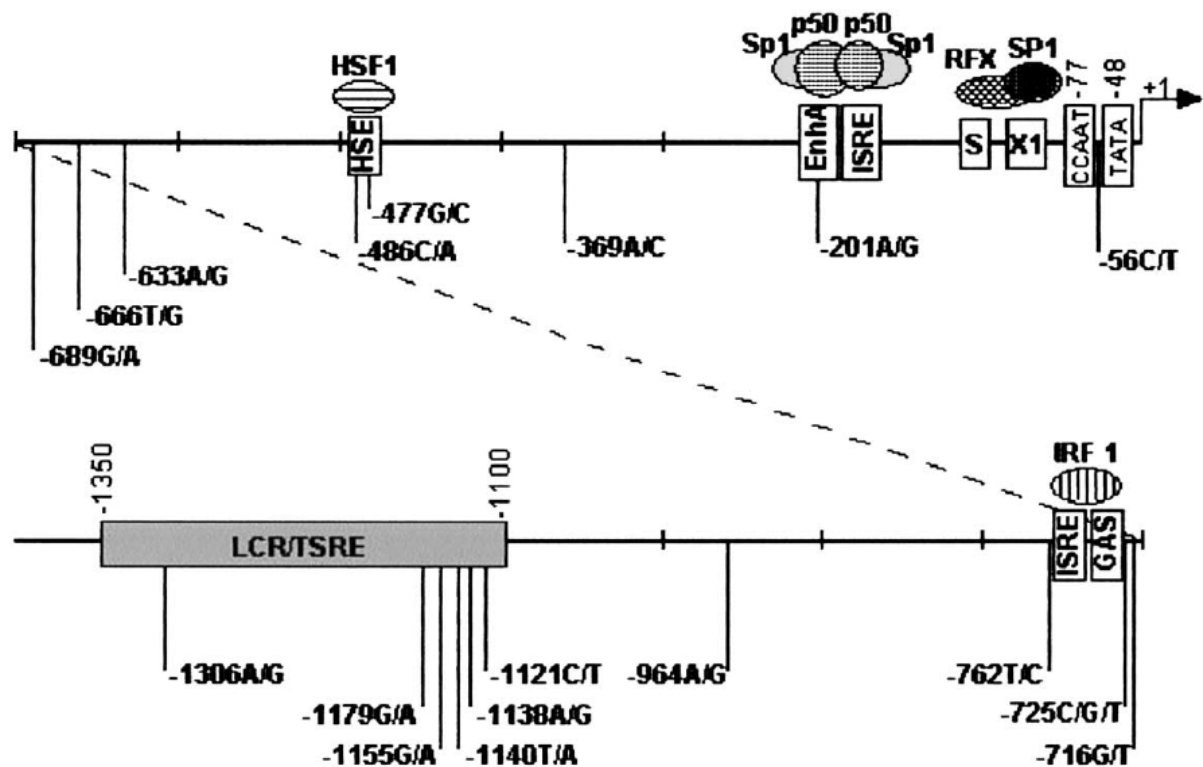


Figura 4: Polimorfismos da região 5'URR do gene *HLA-G* e os sítios de ligação dos fatores transcripcionais reguladores da expressão do gene. Fonte: Ober *et al.*, 2003.

2.5.2.2. Variações na região 3'UTR

Nesta região ocorre um polimorfismo de inserção/deleção de 14 pares de bases, no exon 8 (HARRISON *et al.*, 1993), que pode influenciar na estabilidade do mRNA

(BOHJANEN *et al.*, 1991). Hviid *et al.*, 2003, observaram que há uma relação entre a deleção dessas bases e diferenças no *splicing* alternativo das isoformas de HLA-G e nos seus níveis de expressão.

As posições +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T (CASTELLI *et al.*, 2009), +3142 C/G (TAN *et al.*, 2007), +3187 A/G (YIE *et al.*, 2008) e +3196 C/G (CASTELLI *et al.*, 2009) estão associadas com atividade de regulação de expressão de *HLA-G* pela interação com microRNAs, que são pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcrição (CHUA *et al.*, 2009). A transcrição do alelo +3142G, resulta num mRNA com maior afinidade com os microRNA *hsa-miR-148a*, *hsa-miR-148b* e *hsa-miR-152*, associando a presença dessa variação alélica com a regulação inibitória da expressão de *HLA-G*. Por sua vez, essa variante alélica apresenta-se em desequilíbrio de ligação com o alelo -964G (TAN *et al.*, 2008). A base A na posição +3187 *in vitro* foi associada a diminuição da estabilidade do mRNA, e a baixa expressão de *HLA-G* (YIE *et al.*, 2008).

2.6. INFLUÊNCIA DO HLA-G NA REPRODUÇÃO

O *HLA-G* apresenta uma regulação tecido específica, se comparada aos demais genes HLA de classe I. Desta forma, sua expressão já foi observada na interface materno-fetal (GERAGHTY *et al.*, 1987; ELLIS *et al.*, 1986), no fígado, olhos, coração, pulmão e rins fetais, além do timo, queratinócitos, células B e T, baço, fígado e rins em adultos (LE BOUTEILLER, 1994). Na interface materno-fetal, observa-se a altos níveis de expressão de *HLA-G*, que parece estar associada a uma atividade imunomoduladora fundamental na fisiologia gestacional (KING *et al.*, 1996). Também estão expressos *HLA-E* e *HLA-C*, único gene de classe I clássico expresso na interface (LE BOUTEILLER *et al.* 1999).

A tabela III mostra alguns estudos publicados sobre a influência da molécula HLA-G em alguns processos, tais como: abortamento espontâneo de repetição (AER) (HVIID *et al.*, 2002; ABBAS *et al.*, 2004; TRIPATHI *et al.*, 2004; ABBAS *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006a; YAN *et al.*, 2006b; XUE *et al.*, 2007; VARGAS, 2011), pré-eclampsia (HYLENIUS *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2007; IVERSEN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008; YIE *et al.*, 2008), reprodução *in vitro* (FUZZI *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004a; HVIID *et al.*, 2004c; NOCCI *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2005; SHER *et al.*, 2005; REBMANN *et al.*, 2007;

BORGATTI *et al.*, 2008; VERCAMMEN *et al.*, 2008; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2009; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010), características do embrião a ser selecionado (JURISICOVA *et al.*, 1996; HUNT *et al.*, 2000; HVIID *et al.*, 2003; ROSSEAU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2008) e características do recém nascido (HVIID *et al.*, 2004b).

Tabela III: Revisão dos estudos que investigam *HLA-G* e sua influência em diferentes etapas do processo reprodutivo

Autores (ano)	População estudada	Processo associado	Regiões do <i>HLA-G</i> estudada	Resultado da associação
Juriscova <i>et al.</i> (1996)	Canadá	Expressão do <i>HLA-G</i> e as taxas de clivagem dos embriões	mRNA do <i>HLA-G</i> e cadeia de microglobulina β_2	Expressão do <i>HLA-G</i> está associada com a implantação do embrião
Hunt <i>et al.</i> (2000)	EUA	Isoformas solúveis de <i>HLA-G</i> no sangue materno	Isoformas solúveis de <i>HLA-G</i>	Ausência da isoforma <i>HLA-G</i> 1 solúvel não é indispensável no sucesso gestacional.
Fuzzi <i>et al.</i> (2002)	Itália	s <i>HLA-G</i> e FIV	Isoforma <i>HLA-G</i> 5 ou <i>G</i> 1 solúvel	A expressão de <i>HLA-G</i> é essencial para a implantação.
Hviid <i>et al.</i> (2002)	Dinamarca	AER	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp é mais freqüente em mulheres do que em homens no grupo paciente
Hviid <i>et al.</i> (2003)	Dinamarca	Alelos <i>HLA-G</i> e nível de mRNA no primeiro trimestre de células trofoblásticas.	mRNA do <i>HLA-G</i> , alelos <i>HLA-G</i> e - +14/-14bp exon 8	Alelos com a inserção de 14bp são baixos secretores de mRNA de <i>HLA-G</i> .
Rousseau <i>et al.</i> (2003)	França	mRNA em células de coriocarcinoma de JEG-3 e de melanoma M8	+14/-14bp exon 8	mRNA sem os 14bp são mais estável que os que apresentam os 14bp
Abbas <i>et al.</i> (2004)	Índia	AER	Exon 2 e exon 3	<i>HLA-G</i> *010103, *010105, *010108 e *0105 encontrados em pacientes com AER, e *010107 ausente neste grupo
Hysenius <i>et al.</i> (2004)	Dinamarca	Pré-eclampsia	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp no feto associado com pré-eclampsia
Hviid <i>et al.</i> (2004a)	Dinamarca	FIV	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp associado com o sucesso no tratamento
Hviid <i>et al.</i> (2004b)	Dinamarca	Peso ao nascer	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/+14bp associado com um maior peso ao nascer

Tabela III: Continuação

Hviid <i>et al.</i> (2004c)	Dinamarca	Isoformas G1 e G5 e FIV	Região 5'URR e 3'UTR	Polimorfismos nessas regiões podem influenciar a expressão de sHLA-G, sendo importante para o sucesso da gravidez
Tripathi <i>et al.</i> (2004)	Índia	AER	+14/-14bp exon 8	NS ¹
Nocci <i>et al.</i> (2005)	Itália	sHLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é essencial para a implantação.
Sher <i>et al.</i> (2005)	EUA	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	Expressão de sHLA-G é o verdadeiro marcador de qualidade de embriões.
Yao <i>et al.</i> (2005)	Inglaterra	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	Expressão de sHLA-G não é o mais importante marcador de qualidade de embriões.
Abbas <i>et al.</i> (2006)	Índia	Expressão do HLA-G e AER	Isoformas HLA-G1, G2, G3 e G4	NS
Yan <i>et al.</i> (2006a)	China	AER	+14/-14bp exon 8	NS
Yan <i>et al.</i> (2006b)	China	AER	Exon 2, exon 3 e exon 4	NS
Rebmann <i>et al.</i> (2007)	Alemanha	Expressão de HLA-G e FIV	Isoforma solúvel HLA-G	Expressão de sHLA-G é importante na identificação e seleção de embriões.
Xue <i>et al.</i> (2007)	China	AER	+14/-14bp exon 8	NS
Vianna <i>et al.</i> (2007)	Brasil	Pré-eclampsia	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/-14bp tem efeito protetor contra pré-eclampsia
Borgatti <i>et al.</i> (2008)	Itália	FIV	sICAM ²	Biomarcador para seleção dos embriões
Chen <i>et al.</i> (2008)	China	Expressão de sHLA-G	+14/-14bp exon 8	Menos expressão de sHLA-G nos homozigos com a presença dos 14bp
Iversen <i>et al.</i> (2008)	Noruega	Pré-eclâmpsia	+14/-14bp exon 8	NS
Tan <i>et al.</i> (2008)	Singapura e Malásia	Alelos paternos na pré- eclampsia	Exon 2, exon 3 e exon 4	HLA-G*0106 paterno aumenta a suscetibilidade à pré-eclâmpsia
Vercammen <i>et al.</i> (2008)	Bélgica	Nível do sHLA-G em embriões de FIV e ICSI ³	Forma solúvel	Presença de sHLA-G aumenta a eficiência do processo de fertilização
Yie <i>et al.</i> (2008)	Canadá	Pré-eclâmpsia	3'-UTR	Aumenta a suscetibilidade a pré-eclâmpsia, por instabilidade no mRNA

Tabela III: Continuação

Sipak-Szmigiel <i>et al.</i> (2009)	Polônia	FIV	Região promotora e +14/-14bp exon 8	Inserção/deleção associado com o insucesso da FIV
Kotze <i>et al.</i> (2010)	EUA	sHLA-G e ICSI	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é importante para a implantação.
Rebmann <i>et al.</i> (2010)	Alemanhã	sHLA-G e FIV	Isoforma HLA-G5 ou G1 solúvel	A expressão de HLA-G é importante para a implantação.
Vargas (2011)	Brasil	AER	+14/-14bp exon 8	Genótipo +/-14bp mais freqüente em controles

¹NS: não significativo; ²sICAM: moléculas solúveis de adesão intracelular; ³ICSI: injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

Sabendo que a gestação é um estado fisiológico multifatorial e que por isso sofre a influência de fatores genéticos e ambientais, percebe-se a dificuldade em alcançar um consenso sobre o real papel do *HLA-G* na gestação e sobre a influência dos diferentes alelos no curso de uma gestação. Devido aos vários estudos controversos na área e devido a ausência de pesquisas em pacientes submetidos a tratamento de FIV na região sul do Brasil, faz-se necessário uma análise da relação dos polimorfismos das regiões 5'URR e 3'UTR do *HLA-G* com a eficácia da implantação do embrião após tratamento de FIV.

3. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Frequency analysis of 16 SNPs located in the HLA-G 5'URR region in couples undergoing to assisted reproduction

COSTA, CH¹; GELMINI, GF¹; WOWK, PF¹; MATTAR, SB¹; VARGAS, RG¹; ROXO, VMS¹; SCHUFFNER, A²; BICALHO, MG¹.

¹ Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil.

² Centro de Medicina Reprodutiva Conceber, Curitiba (PR), Brasil

ABSTRAT

INTRODUCTION: The *HLA-G* gene has been investigated in several clinical conditions related to reproduction. Couples with spontaneous recurrent miscarriage, women with pre-eclampsia or who underwent assisted reproduction treatment have participated in case-controls studies whose main objective is to obtain information that could shed light on the involvement of HLA-G in these clinic conditions. Important polymorphisms exist in the 5'URR and 3'UTR regulatory regions of *HLA-G*. **OBJECTIVES:** This case-control study investigated 16 SNPs in the promoter region of the *HLA-G* gene, from position -1449 to -304 (-369A/C; -477G/C; -486C/A; -633A/G; -666T/G; -689G/A; -716G/T; -725C/G/T; -762T/C; -964A/G; -1121C/T; -1138A/G; -1140T/A; -1155G/A; -1179G/A; -1306A/G), and their possible association with conception resulting from assisted reproduction technology (ART). **METHODS:** The patient group was composed of 19 couples (n = 38) undergoing ART. Sixty-nine couples (n = 138), with 2 or more term pregnancies and with no records of other reproductive problems, were considered as the control group. **RESULTS:** The analysis of genotypic frequencies showed a significant decrease ($p \leq 0.01$) in positions -1306G/G, -

1179A/A and -1121C/T in the patient group, as well as a significant increase in the frequencies of -1155G/G, -1138A/A and -964A/G in the control group. The patient group showed significant higher frequencies of -1306A, -1179G and -1121C alleles whereas in the control group the -1138A and -964G alleles were more frequent ($p \leq 0.01$). The -725C/G/T SNP has been repeatedly associated with the methylation profile of CpG dinucleotides; interestingly our case-control couples presented similar frequencies when both groups were compared. When comparisons were made within the control group, male were significantly different than female. CONCLUSIONS: Our conclusions lead us to confirm the important role of the already known -725C/G/T SNP and suggest that additional nearby variations at the *HLA-G* promoter region can also influence gene regulation and consequently the implantation process which depends on the immunomodulatory action of the HLA-G isoforms.

KEYWORDS

5'URR, HLA-G, human reproduction, SNP

INTRODUCTION

When a natural conception is not achieved, assisted reproductive technologies (ART) which includes artificial insemination (AI) and in vitro fertilization (IVF) are currently available to couples who are trying to conceive [1]. During the pregnancy, both the embryo and the endometrium stimulate changes in the maternal immune system, in order to have a successful implantation [2].

Major Histocompatibility Complex (MHC) genes are responsible for the synthesis of proteins that play an important role in the adaptive immune response. In humans, the group of genes referred to as MHC are denominated Human Leucocyte Antigens (HLA) and it is located on chromosome 6, 6p21.3 [3].

In recent years, there is an increasing amount of information about a very special HLA gene, named *HLA-G*. Discovered for the first time in the maternal-fetal interface it was considered an important immunomodulatory molecule. Several studies have described an association between the presence of soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G) in human

embryo culture supernatants (ES) and implantation success [4-10].

In 1987, Geraghty *et al.* [11], identified a gene sequence in the MHC region that was later named *HLA-G* whose gene structure was similar to HLA class I genes, with eight exons, seven introns and a 3' non-translated region (3'UTR). However, the sixth exon of *HLA-G* presents a nucleotide variation these results in a termination codon. As a consequence the resulting protein has a cytoplasmatic segment with 6 amino acids only, in contrast to other classic HLA Class I proteins which present 30 amino acids in this highly conserved region. Ellis *et al.*, 1990 [12], classified *HLA-G* as a non-classic class I gene. Lately, a tolerogenic role was assigned to *HLA-G* through NK cells inhibitory receptors binding, more specifically to the KIR2DL4 receptor as well as to the leukocyte immunoglobulin-like inhibitory receptors 1 (LIR1 or ITL2) and LIR-2 (or ILT-4), or by its interaction with *HLA-E*, which binds to CD94/NKG2 [13].

Exons 2, 3 and 4 code for $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 3$ domains of *HLA-G* protein, respectively. While the first two domains define the peptide binding cleft, the $\alpha 3$ domain harbours the LIR-1 and LIR-2 receptor binding epitopes, in a distinct interaction from that observed in classic class I molecules and the $\beta 2$ -microglobulin chain [14, 15].

Due to alternative splicing, *HLA-G* may present seven different isoforms, such as a membrane bound forms (*HLA-G1*, *G2*, *G3* and *G4*) and soluble forms (*HLA-G5*, *G6* e *G7*) [16]. Soluble forms result from the retention of intron 2 or 4 during mRNA processing. The resulting mature transcript has a termination codon that encodes for a protein without the membrane-binding domain [17].

Plasma levels of s*HLA-G* are directly influenced by *HLA-G* alleles. In 2001, Rebmann *et al.* [18] observed that low levels of s*HLA-G* are expressed in individuals bearing *HLA-G*01:03* and *HLA-G*01:05N* alleles. Alleles *G*01:04:01* and *G*01:01* result in high expression levels of s*HLA-G*, while intermediate levels have been associated with alleles *G*01:01:08* e *G*01:04*.

Important polymorphisms are also present in the 5' regulatory region and the 3' untranslated region (5'URR and 3'UTR, respectively) and are associated with *HLA-G* gene expression and protein levels regulation [19].

Some studies suggest that a SNP in position -725C/G/T [20] in the 5'URR with the presence of guanine may alter the methylation profile of CpG dinucleotides resulting in a modification of gene expression. Position -726 is methylated in the majority of cells bearing

the -725G allele. This epigenetic modification may influence the binding of IRF-1 in ISRE located around 10 base pairs 3' from the polymorphic position [20, 21].

HLA-G presents an exclusive tissue specific regulation when compared to the other HLA Class I genes. Expression has been observed at the maternal-fetal interface [12, 22], in the fetal liver, eyes, heart, lungs and kidneys, besides the thymus, keratinocytes, B and T cells, spleen and kidneys in adults [23].

At the fetal-maternal interface an allogenic immune response would be expected. The absence of MHC Class I (Ia) molecules is considered as one of the reasons for this non-response. However, it is well known that the trophoblast expresses HLA-C, as well as other non-classical HLA molecules, such as HLA-G and HLA-E. This non canonic profile has been associated with immune modulatory functions that play an important role in gestational outcome [24, 25].

In the present study, we sequenced approximately 1400 base pairs (bp) of the HLA-G promoter region, targeting 16 SNPs already described in previous studies by other groups [20, 26], in 19 couples (n = 38) undergoing ART and 69 control couples (n = 138) in order to assess if these variations may confer any prognostic value to IVF or AI treatment.

MATERIALS AND METHODS

Case and Control Sample

Our case group included 19 Euro-Brazilian couples undergoing ART due to difficulties in natural conception related to female or male fertility. The couples were mainly selected from the “Conceber - Centro de Medicina Reprodutiva” in the state of Parana, Southern Brazil, between October 2009 and October 2010. The exclusion criteria comprised female age > 35 years, endometriosis, anatomical abnormalities of the uterus, abnormal karyotypes, history of autoimmune disease, retrieved oocytes <3 and the existence of obstructive azoospermia in males.

The 94 control couples were voluntary participants, unrelated to the cases, with two or more children and without history of idiopathic miscarriages or other reproductive

problems. These blood samples have been assembled since 1997 at the Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH) of the Genetics Department, Federal University of Paraná UFPR (Brazil). The case and control couples were grouped according to ethnic, social and economic status.

The Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the UFPR (HC-UFPR) approved the study (CEP-HC n°037ext.019/2001-07), and all participants from both groups signed a free and informed consent form and completed a personal and occupational questionnaire.

HLA-G Genotyping

Peripheral blood DNA extraction was carried out with the salting out technique described by Lahiri and Nurnberger [27]. PCR reactions included the following: Taq 1X buffer (70 Mm Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0.45 pM of each dNTP, 2 mM MgCl, 2 U *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 pM of each specific primer pair and 50 ng/μL of DNA.

Amplification of 16 SNPs in the 5'URR of the *HLA-G* was performed in two distinct fragments, each one with the following primers (described by [28]): forward ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG , reverse GTGTGCCTTTGAATCCCGATGC, and forward CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC, reverse TGTGACTCTGTCTTGCAACCG, resulting in 638 bp and 637 bp PCR products, respectively. The initial denaturation cycle was carried out at 96°C for 5 min; followed by 35 cycles at 96°C for 30 sec, 66°C for 30 sec and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. The resulting amplicon was purified with 10 U of Exonuclease I and 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Staufen, Germany) to remove excess of primers and dNTPs, followed by a sequencing reaction with ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). Sequencing products were eluted by electrophoresis using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). The primers used in the direct DNA sequencing were the same as the PCR amplification. All sequences obtained were aligned using SeqScape Software 2.5 version (Applied Biosystems, CA, USA) and compared to

FASTA sequence obtained from Ensemble. After that each SNP detected was individually noted.

Statistics

Genotypic and allelic frequencies were determined by direct counting. The comparisons between samples (cases *vs.* controls; successes *vs.* failures in assisted reproduction treatment) were performed in 3x2 (G-test) and 2x2 (Fisher's exact test) contingency tables using the GENEPOP version 4.0.10 and BIOESTAT version 5.0 programs, respectively, with significance set at $p \leq 0.01$. Odds ratios were calculated using BIOESTAT 5.0 with 95% confidence intervals.

Estimation of the haplotype frequencies was performed with ARLEQUIN version 3.11. The expectation-maximization (EM) algorithm was used to determine the SNP haplotype frequencies in the 5'URR of HLA (1,000 bootstrap replicates) and the linkage disequilibrium values [29].

RESULTS

Allelic, genotypic and haplotypic frequencies of 16 SNPs located in *HLA-G* 5'URR.

Both case and control groups were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p \leq 0.05$ data not shown) for the 16 SNPs located in the 5'URR HLA-G promoter region between positions -1447 and -304.

By comparing the SNP's allelic frequencies between cases and controls in the total sample a higher frequency of -1306A, -1179G and -1121C alleles was observed in the case group. Higher frequencies were reported for -1138A and -964G alleles in the control group ($p \leq 0.01$). Genotypic frequencies were also compared and a significant decrease in the

frequency of -1306G/G, -1179A/A and -1121C/T genotypes in the case group, as well as a significant increase in the frequency of -1155G/G, -1138A/A, -964A/G genotypes in the control group ($p \leq 0.01$) was observed (Table I).

The case and control samples were stratified according to sex and the allelic and genotypic frequencies were compared between male and female within groups (case and controls). No significant statistic differences were observed among all the comparisons performed.

Additional stratification was performed comparing case female vs control female, as well as case male vs control male. In female submitted to assisted reproduction treatments (case group) a significant decrease ($p \leq 0.01$) in the frequency of -1306G, -1179A, -1121T, -964G, -762C, -716T, -689A, -666G and -486A alleles and -1306 G/G, -1179A/A, -964G/G, -762C/C, -716T/T, -689A/A, -666G/G and -486A/A genotypes was observed. In control female group an increased frequency was observed for the -1155G, -1140A, -633G alleles (Table II).

In case male, a lower significant frequency ($p \leq 0.01$) in the -1179A allele was found. The -1121T allele wasn't present in this group. Considering the low frequency of the -1138G allele in both groups ($p \leq 0.01$) and as a consequence the -1138G/G genotype wasn't observed either in case male or control male (Table III).

In Table IV are only represented the more frequent haplotypes (Cut-off=0,01) for both case and control groups. Six haplotypes were observed in the control group exclusively. The remaining 7 haplotypes were shared by both groups and no differences were observed in haplotypic frequencies between case and control groups (Table IV).

DISCUSSION

For a long time, *HLA-G* has been considered an important mediator of fetal-maternal tolerance during pregnancy [4, 30]. Sequences and polymorphisms upstream exon 1 in the 5'URR of *HLA-G* might be of importance in the control of its expression [20, 21].

Pregnancy outcome has been widely investigated by different groups. Studies of association between polymorphisms of *HLA-G* and reproduction began in the past decade, and many of them reported a positive association with *HLA-G* polymorphisms.

Juriscova et al. in 1996 [31] were among the first to demonstrate that embryos expressing HLA-G mRNA showed higher cleavage rate compared to embryos that do not express the same molecule. Since then several studies have analyzed the possible implication of HLA-G molecules in the selection of embryos and oocytes for ART [5-9]. Other groups also correlated the ART to the analysis of HLA-G genotypes, as well as with the expression of HLA-G protein in culture supernatants and the embryo to be selected for IVF [32-38].

This is the first study to address the 16 SNPs at the 5'UTR of *HLA-G* promoter region, in case couples who underwent ART and their controls, in the state of Parana, Southern Brazil. Our aim was to determine whether the *HLA-G* 5'UTR genetic variation was associated with the outcome of pregnancy and their diagnostic and prognostic value in ART. The comparisons performed between case and controls allowed us to draw the allelic, genotypic and haplotypic SNP's pattern in 5'UTR of HLA-G in case and controls.

Table I: Genotypic and allelic frequencies comparison between case (n=38) and control (n=138) group of 16SNPs located in *HLA-G* 5'URR.

-1306A/G					OR A/A-A/G		OR A/A-G/G		-1306A/G			OR				
A/A	A/G	G/G	(CI)		(CI)	A	G	(CI)								
Case group	13	20	5	p=0.0007	2.87 (1.19-6.87)	7.03 (2.18-22.71)			46 (0.60)	30 (0.40)	p=0.0035	2.35 (1.39-3.94)				
Control group	17	75	46						109 (0.40)	167 (0.60)						
-1179G/A					OR G/G-G/A		OR G/G-A/A		-1179G/A							
G/G	G/A	A/A	(CI)		(CI)	G	A									
Case group	14	21	3	p=0.0000	2.78 (1.18-6.57)	12.08 (3.08-47.38)			49 (0.64)	27 (0.36)	p=0.0005	2.69 (1.59-4.57)				
Control group	17	77	44						111 (0.40)	165 (0.60)						
-1155G/A					OR G/G-G/A		OR G/G-A/A		-1155G/A							
G/G	G/A	A/A	(CI)		(CI)	G	A									
Case group	27	10	1	p=0.01	0.41 (0.17-0.97)	0.11 (0.01-1.32)			64 (0.84)	12 (0.16)	p=0.03	0.372 (0.17-0.81)				
Control group	120	18	0						258 (0.93)	18 (0.07)						
-1140T/A									-1140T/A							
T/T	T/A	A/A						T	A							
Case group	5	20		13				p=0.15					30 (0.40)	46 (0.60)	p=0.11	
Control group	12	61		65									85 (0.31)	191 (0.69)		
-1138A/G						OR A/A-A/G		OR A/A-G/G		-1138A/G						
A/A	A/G	G/G	(CI)		(CI)	A	G									
Case group	32	6	0	p=0.0038	0.12 (0.028-0.5)	0.24 (----)			70 (0.92)	6 (0.08)	p=0.01	0.128 (0.03-0.52)				
Control group	135	3	0						273 (0.99)	3 (0.01)						
-1121C/T					OR C/C-C/T		OR C/C-T/T		-1121C/T							
C/C	C/T	T/T	(CI)		(CI)	C	T									
Case group	37	1	0	p=0.0020	11.27 (1.49-85.46)	0.72 (----)			75 (0.99)	1 (0.01)	p=0.0013	10.537 (1.42-78.28)				
Control group	105	32	1						242 (0.88)	34 (0.12)						
-964A/G					OR A/A-A/G		OR A/A-G/G		-964A/G							
A/A	A/G	G/G	(CI)		(CI)	A	G									
Case group	12	20	6	p=0.0022	2.77 (1.13-6.80)	6.00 (1.93-18.6)			44 (0.58)	32 (0.42)	p=0.0035	2.2 (1.31-3.69)				
Control group	16	74	48						106 (0.38)	170 (0.62)						
-762T/C									-762T/C							
T/T	T/C	C/C						T	C							
Case group	11	21		6				p=0.06					43 (0.57)	33 (0.43)	p=0.04	
Control group	26	70		42									122 (0.43)	154 (0.57)		
-725C/G/T								-725C/G/T								
C/C	C/G	G/G	C/T	G/T	T/T		C	G	T							
Case group	25	7	0	6	0		0	63 (0.83)	7 (0.09)				6 (0.08)			
Control group	95	19	2	20	1	1	p=1.00	229 (0.83)	24 (0.09)			23 (0.08)	p=1.00			

Table I: Continued

-716G/T				-716G/T			
	G/G	G/T	T/T		G	T	
Case group	11	21	6	p=0.06	43	33	p=0.04
Control group	26	70	42		(0.57)	(0.43)	
					122	154	
					(0.44)	(0.56)	
-689G/A				-689G/A			
	G/G	G/A	A/A		G	A	
Case group	11	20	7	p=0.09	42	34	p=0.07
Control group	26	70	42		(0.55)	(0.45)	
					122	154	
					(0.44)	(0.56)	
-666T/G				-666T/G			
	T/T	T/G	G/G		T	G	
Case group	11	21	6	p=0.06	43	33	p=0.04
Control group	26	70	42		(0.57)	(0.43)	
					122	154	
					(0.44)	(0.56)	
-633A/G				-633A/G			
	A/A	A/G	G/G		A	G	
Case group	11	18	9	p=0.19	40	36	p=0.12
Control group	26	70	42		(0.53)	(0.47)	
					122	154	
					(0.44)	(0.56)	
-486C/A				-486C/A			
	C/C	C/A	A/A		C	A	
Case group	11	21	6	p=0.06	43	33	p=0.04
Control group	26	70	42		(0.57)	(0.43)	
					122	154	
					(0.44)	(0.56)	
-477G/C				-477G/C			
	G/G	G/C	C/C		G	C	
Case group	14	21	3	p=0.04	49	27	p=0.02
Control group	37	65	36		(0.64)	(0.36)	
					139	137	
					(0.50)	(0.50)	
-369A/C				-369A/C			
	A/A	A/C	C/C		A	C	
Case group	14	21	3	p=0.04	49	27	p=0.02
Control group	37	65	36		(0.64)	(0.36)	
					139	137	
					(0.50)	(0.50)	

Table II: Genotypic and allelic frequencies comparison between case female (n=19) and control female (n=69) of 16SNPs located in *HLA-G* 5'URR.

-1306A/G				OR A/A-A/G		OR A/A-G/G		-1306A/G		OR	
	A/A	A/G	G/G		(CI)	(CI)		A	G		(CI)
Case female	7	10	2	p=0.0031	2.89 (0.84-9.94)	12.25 (2.11-71)		24 (0.63)	14 (0.37)	p=0.0001	3.11 (1.47-6.56)
Control female	8	33	28					49 (0.35)	89 (0.65)		
-1179G/A				OR G/G-G/A		OR G/G-A/A		-1179G/A			
	G/G	G/A	A/A		(CI)	(CI)		G	A		
Case female	9	8	2	p=0.0015	4.37 (1.31-14.55)	12.5 (2.26-69.19)		26 (0.68)	12 (0.32)	p=0.0000	3.47 (1.61-7.47)
Control female	9	35	25					53 (0.38)	85 (0.62)		
-1155G/A								-1155G/A			
	G/G	G/A	A/A					G	A		
Case female	13	5	1	p=0.04				31 (0.82)	7 (0.18)	p=0.0034	0.24 (0.8-0.72)
Control female	62	7	0					131 (0.95)	7 (0.05)		
-1140T/A								-1140T/A			
	T/T	T/A	A/A					T	A		
Case female	3	11	5	p=0.05				17 (0.45)	21 (0.55)	p=0.006	2.21 (1.05-4.64)
Control female	6	25	38					37 (0.27)	101 (0.73)		
-1138A/G								-1138A/G			
	A/A	A/G	G/G					A	G		
Case female	17	2	0	p=0.57				36 (0.95)	2 (0.05)	p=0.10	
Control female	67	2	0					136 (0.99)	2 (0.01)		
-1121C/T								-1121C/T			
	C/C	C/T	T/T					C	T		
Case female	18	1	0	p=0.02				37 (0.97)	1 (0.03)	p=0.0026	6.64 (0.86-51.07)
Control female	48	21	0					117 (0.85)	21 (0.15)		
-964A/G				OR A/A-A/G		OR A/A-G/G		-964A/G			
	A/A	A/G	G/G		(CI)	(CI)		A	G		
Case female	8	9	2	p=0.0022	3.16 (0.95-1.06)	12.44 (2.22-69.63)		25 (0.66)	13 (0.34)	p=0.0000	3.38 (1.59-7.20)
Control female	9	32	28					50 (0.36)	88 (0.64)		
-762T/C				OR T/T-T/C		OR T/T-C/C		-762T/C			
	T/T	T/C	C/C		(CI)	(CI)		T	C		
Case female	7	10	2	p=0.0077	2.31 (0.7-7.65)	9.1 (1.61-51.46)		24 (0.63)	14 (0.37)	p=0.0003	2.75 (1.31-5.78)
Control female	10	33	26					53 (0.38)	85 (0.62)		
-725C/G/T							-725C/G/T				
	C/C	C/G	G/G	C/T	G/T	T/T		C	G	T	
Case female	14	3	0	2	0	0	p=0.42	33 (0.87)	3 (0.08)	2 (0.05)	p=0.15
Control female	40	14	1	12	1	1		106 (0.77)	17 (0.12)	15 (0.11)	

Table II: Continued

-716G/T					OR G/G-G/T	OR G/G-T/T	-716G/T			
G/G	G/T	T/T	(CI)		(CI)	G	T			
Case female	7	10	2	p=0.009	2.31 (0.7-7.65)	9.1 (1.61-51.46)	24 (0.63)	14 (0.37)	p=0.0003	2.75 (1.31-5.78)
Control female	10	33	26				53 (0.38)	85 (0.62)		
-689G/A					OR G/G-G/A	OR G/G-A/A	-689G/A			
G/G	G/A	A/A	(CI)		(CI)	G	A			
Case female	7	9	3	p=0.01	2.56 (0.76-8.65)	6.07 (1.3-28.2)	23 (0.60)	15 (0.40)	p=0.0014	2.45 (1.18-5.13)
Control female	10	33	26				53 (0.38)	85 (0.62)		
-666T/G					OR T/T-T/G	OR T/T-G/G	-666T/G			
T/T	T/G	G/G	(CI)		(CI)	T	G			
Case female	7	10	2	p=0.0096	2.31 (0.7-7.65)	9.1 (1.61-51.46)	24 (0.63)	14 (0.37)	p=0.0003	2.75 (1.31-5.78)
Control female	10	33	26				53 (0.38)	85 (0.62)		
-633A/G							-633A/G			
A/A	A/G	G/G	A				G			
Case female	7	8	4	p=0.04			22 (0.58)	16 (0.42)	p=0.0035	2.21 (1.06-4.57)
Control female	10	33	26				53 (0.38)	85 (0.62)		
-486C/A					OR C/C-C/A	OR C/C-A/A	-486C/A			
C/C	C/A	A/A	(CI)		(CI)	C	A			
Case female	7	10	2	p=0.01	2.31 (0.7-7.65)	9.1 (1.61-51.46)	24 (0.63)	14 (0.37)	p=0.0003	2.75 (1.31-5.78)
Control female	10	33	26				53 (0.38)	85 (0.62)		
-477G/C							-477G/C			
G/G	G/C	C/C	G				C			
Case female	9	8	2	p=0.06			26 (0.68)	12 (0.32)	p=0.0048	2.29 (1.07-4.91)
Control female	18	31	20				67 (0.49)	71 (0.51)		
-369A/C							-369A/C			
A/A	A/C	C/C	A				C			
Case female	9	8	2	p=0.05			26 (0.68)	12 (0.32)	p=0.0048	2.29 (1.07-4.91)
Control female	18	31	20				67 (0.49)	71 (0.51)		

Table III: Genotypic and allelic frequencies comparison between case male (n=19) and control male (n=69) of 16SNPs located in *HLA-G* 5'URR.

-1306A/G						-1306A/G			OR
						A	G	(IC)	
Case male	6	10	3	p=0.16					
Control male	9	42	18						
						22 (0.58)	16 (0.42)	p=0.03	
						60 (0.43)	78 (0.57)		
-1179G/A						-1179G/A			
G/G G/A A/A						G	A		
Case male	5	13	1	p=0.03					
Control male	8	42	19						
						23 (0.60)	15 (0.40)	p=0.008	2.11 (1.20-4.40)
						58 (0.42)	80 (0.58)		
-1155G/A						-1155G/A			
G/G G/A A/A						G	A		
Case male	14	5	0	p=0.53					
Control male	58	11	0						
						33 (0.87)	5 (0.13)	p=0.18	
						127 (0.92)	11 (0.08)		
-1140T/A						-1140T/A			
T/T T/A A/A						T	A		
Case male	2	9	8	p=1.00					
Control male	6	36	27						
						13 (0.34)	25 (0.66)	p=0.50	
						48 (0.35)	90 (0.65)		
-1138A/G						-1138A/G			
A/A A/G G/G						OR A/A-A/G (CI)		OR A/A-G/G (CI)	
Case male	15	4	0	p=0.007	0.05 (0.01-0.53)	0.23 (----)	34 (0.89)		p=0.0025
Control male	68	1	0				137 (0.99)		
-1121C/T						-1121C/T			
C/C C/T T/T						C	T		
Case male	19	0	0	p=0.05					
Control male	57	11	1						
						38 (1.00)	0 (0.00)	p=0.0016	
						125 (0.91)	13 (0.09)		
-964A/G						-964A/G			
A/A A/G G/G						A	G		
Case male	4	11	4	p=0.29					
Control male	7	42	20						
						19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.12	
						56 (0.41)	82 (0.59)		
-762T/C						-762T/C			
T/T T/C C/C						T	C		
Case male	4	11	4	p=1.00					
Control male	16	37	16						
						19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.55	
						69 (0.50)	69 (0.50)		
-725C/G/T						-725C/G/T			
C/C C/G G/G C/T G/T						C	G	T	
Case male	11	4	0	4	0	30 (0.80)	4 (0.10)	4 (0.10)	p=0.14
Control male	55	5	1	8	0	123 (0.89)	7 (0.05)	8 (0.06)	

Table III: Continued

-716G/T					-716G/T		
	G/G	G/T	T/T		G	T	
Case male	4	11	4	p=1.00	19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.55
Control male	16	37	16		69 (0.50)	69 (0.50)	
-689G/A					-689G/A		
	G/G	G/A	A/A		G	A	
Case male	4	11	4	p=1.00	19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.55
Control male	16	37	16		69 (0.50)	69 (0.50)	
-666T/G					-666T/G		
	T/T	T/G	G/G		T	G	
Case male	4	11	4	p=1.00	19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.55
Control male	16	37	16		69 (0.50)	69 (0.50)	
-633A/G					-633A/G		
	A/A	A/G	G/G		A	G	
Case male	4	10	5	p=0.85	18 (0.47)	20 (0.53)	p=0.39
Control male	16	37	16		69 (0.50)	69 (0.50)	
-486C/A					-486C/A		
	C/C	C/A	A/A		C	A	
Case male	4	11	4	p=1.00	19 (0.50)	19 (0.50)	p=0.55
Control male	16	37	16		69 (0.50)	69 (0.50)	
-477G/C					-477G/C		
	G/G	G/C	C/C		G	C	
Case male	5	13	1	p=0.35	23 (0.61)	15 (0.39)	p=0.16
Control male	19	34	16		72 (0.52)	66 (0.48)	
-369A/C					-369A/C		
	A/A	A/C	C/C		A	C	
Case male	5	13	1	p=0.35	23 (0.61)	15 (0.39)	p=0.16
Control male	19	34	16		72 (0.52)	66 (0.48)	

Table IV: More frequent haplotypes and their frequencies estimation in case (n=76) and control (n=276) groups of 16SNPs located in *HLA-G* 5'URR.

	Haplotype															Case		Control		Freq.	
	-1306A/G	-1179G/A	-1155G/A	-1140T/A	-1138A/G	-1121C/T	-964A/G	-762T/C	-725C/G/T	-716G/T	-689G/A	-666T/G	-633A/G	-486C/A	-477G/C	-369A/C	Female (n=19)	Male (n=19)	Female (n=69)		Male (n=69)
1	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	T	G	A	C	C	0.020	0.025	0.122	0.137	0.304
2	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	G	A	C	G	A	0.037	0.034	0.081	0.121	0.273
3	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	G	A	C	G	A	0.016	0.009	0.016	0.016	0.057
4	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	G	A	C	G	A	0.003		0.022	0.024	0.049
5	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	T	G	A	C	C	0.006	0.008	0.023	0.011	0.048
6	A	G	G	A	A	C	A	T	C	G	G	G	A	C	G	A	0.006	0.006	0.013	0.006	0.031
7	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	T	G	A	C	C			0.021	0.005	0.026
8	G	A	G	A	A	T	G	T	C	G	G	G	A	C	G	A			0.012	0.012	0.024
9	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	T	G	A	C	C		0.003	0.010	0.010	0.023
10	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	A	G	A			0.015		0.015
11	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	T	G	A	G	A			0.011		0.011
12	G	A	G	A	A	T	G	C	T	T	A	T	G	A	G	A			0.008	0.003	0.011
13	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	A	C	C			0.003	0.007	0.010

Ober et al., 2003 [20] described that the -725C/G variation, was associated with fetal loss, with an increased risk for miscarriage in couples in which both partners carried the -725G allele, compared with couples not carrying this allele ($p=0.035$; $OR=2.76$; $95\% CI=1.08-7.09$;). According to their comments, the G at nucleotide -725 creates a CpG dinucleotide and they demonstrate that this CpG site was methylated on -725G alleles. This putative methylation site could be acknowledged as an important position in the regulation of *HLA-G* gene expression.

In a previous study of our group, Silva *et al.* [28] sequenced the same 1400 bp *HLA-G* 5'URR promoter region and carried out a genetic study in couples with recurrent spontaneous miscarriages (RSM). Their results regarding the polymorphic site -725C/G/T were similar to those reported by Ober *et al.* in the Hutterite community [20].

The unusual feature of the cis-acting regulatory elements in the promoter region of *HLA-G* may determine their differential responsiveness to master transcriptional inducers of MHC class Ia genes (NF- κ B, IRF-1 and Class II transactivator). As a consequence, a tight transcriptional gene control and tissue-restricted expression favour the presence of *HLA-G* at the fetal-maternal interface during pregnancy.

Regarding to the SNP -725C/G our findings were different from those reported by Ober and others who investigated *HLA-G* polymorphisms and reproduction. They concluded

that -725G alleles/genotypes were associated with susceptibility to pregnancy complications, as a result of the down regulation of *HLA-G* transcription. In the present study the -725G allele showed similar frequencies in both case and control groups.

Moreover, SNPs -1306A/G, -1179G/A, -1155G/A, -1138A/G, -1121C/T, -964A/G showed differences in allelic and/or genotypic frequencies when comparisons between case and controls were performed. Interestingly, when case and control samples were stratified according to sex it was observed that SNP -1306G, both allele ($p = 0.0001$; OR = 3.11; CI = 1.47-6.56) and genotypes -1306GG ($p = 0.0031$; OR = 2.89; CI = 0.84-9.94) remained in lower frequencies in case female.

The 16 SNPs genotyping in the promoter region of *HLA-G*, upstream exon 1, allowed the estimation of 7 haplotypes presented in both control and case group, whereas 6 unique haplotypes were presented only in control group.

These findings lead us to suggest and add evidences that, other SNPs, e.g. -1306 apart from -725, could act as a target site like a “tag SNP” in the midst of regulatory sequences, equally relevant in controlling the *HLA-G* gene expression. In fact, the *HLA-G* gene region that spans from position -1350 to -1100 in *HLA-G* 5' regulatory region, includes important regulatory loci, such as, the locus control region (LCR) and tissue specific regulatory element (TSRE) [20]. Nucleotide variation in this region that disrupts transcription factor binding sites may impact on the regulation of expression of certain HLA-G alleles by avoiding the binding of transcriptional factors.

It is widely accepted that *HLA-G* polymorphisms in 5'URR might influence the expression of HLA-G transcript and protein. Several studies were carried out in other population to evaluate the important role of HLA-G in clinical practice. However, the findings of the actual study were not enough to establish association and prognostic value between the polymorphisms investigated and couples who underwent ART. More and larger studies remain to be done to clarify the influence and the potential prognostic value of HLA-G 5'URR polymorphism in assisted reproduction treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the research fund of FUNPAR- LIGH. We are most grateful to couples for generously accorded to provide samples for this study. We also thank Clínica Conceber and LIGH staff for technical support.

REFERENCES

- [1] Goldberg, J.M.; Falcone, T.; Attaran, M.; In vitro fertilization update. *Cleveland clinic journal of medicine* 2007;74:329-38.
- [2] Pauli, S.A.; Berga, S.L.; Shang, W.; Session, D.R.; Current status of the approach to assisted reproduction. *Pediatric Clin N Am* 2009;56:467-488.
- [3] Van Der Ven, K.; Pfeiffer, K.; Skrablin, S; HLA-G polymorphisms and molecule function – questions and more questions – a review. *Placenta* 2000; 21:86-92.
- [4] Fanchin,R.; Gallot, V.; Rouas-Freiss, N.; Frydman, R.; Carosella, E.D.; Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Hum Immun* 2007;68:259-63.
- [5] Fuzzi, B.; Rizzo, R.; Criscuoli, L.; Noci, I.; Melchiorri, L.; Scarselli, B.; Bencini, E.; Menicucci, A.; Baricordi, O.R.; HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunogenet* 2002;32:311-5.
- [6] Nocchi, I.; Fuzzi, B.; Rizzo, R.; Melchiorri, L.; Criscuoli, L.; Dabizzi, S.; Biagiotti, R.; Pellegrini, S.; Menicucci, A.; Baricordi, O.R.; Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20:138-46.
- [7] Vercammen, M.J.; Verloes, A.; Van De Velde, H.; Haentjens, P.; Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility: meta-analysis. *Hum Reprod Up* 2008;14:209-18.
- [8] Kotze, D.J.; Hansen, P.; Keskinetepe, L.; Snowden, E.; Sher, G.; Kruger, T.; Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome. *J Assit Reprod Genet* 2010;27:309-16.
- [9] Rebmann, V.; Switala, I.; Eue, I.; Grosse-Wilde, H.; Soluble HLA-G is na independent factor for the prediction of pregnancy out come after ART: a German multi-center study. *Human Reprod* 2010;25:1691-8.
- [10] Rizzo, R.; Stignani, M.; Melchiorri, L.; Baricordi, O.R.; Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo scretome. *Hum Immunol* 2009;70:970-5.
- [11] Geraghty, D.E.; Koller, B.H.; Orr, H.T.; A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987; 84:9145-9.
- [12] Ellis, S.A.; Palmer, M.S.; Mcmichael, A.J.; Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol* 1990; 144:731-5.

- [13] Navarro, F.; Llano, M.; Bellon, T.; Colonna, M.; Geraghty, D.E.; Lopez-Botet, M.; The ILT-2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 e HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 1999;29:277-83.
- [14] Lee, N.; Malacko, A.R.; Ischitani, A.; Chen, M.C.; Bajorath, J.; Marquardt, H.; Geraghty, D.E.; The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity* 1995;3:591-600.
- [15] Diehl, M.; Münz, C.; Keilholz, W.; Stevanovic, S.; Holmes, N.; Loke, Y.W.; Rammensee, H.G.; Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Cur Biol* 1996;6:305-14.
- [16] Le Bouteiller, P.; Blaschitz, A.; The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 1999;167:233-44.
- [17] Blaschitz, A.; Juch, H.; Volz, A.; Hutter, H.; Daxboeck, C.; Desoye, G.; Dohr, G.; The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms. *Molecular Hum Reprod* 2005;11:699-710.
- [18] Rebmann, V.; Van Der Ven, K.; Päßler, M.; Pfeiffer, K.; Krebs, D.; Grosse-Wilde, H.; Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001;57:15-21.
- [19] Hviid, T.V.F.; HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Up* 2006;12:209-32.
- [20] Ober, C.; Aldrich, C.L.; Chervoneva, I.; Billstrand, C.; Rahimov, F.; Gray, H.L.; Hyslop, T.; Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 2003;72:1425-35.
- [21] Lefebvre, S.; Moreau, P.; Guiard, V.; Ibrahim, E.C.; Adrian-Cabestre, F.; Menier, C.; Dausset, J.; Carosella, E.D.; Paul, P.; Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types. *J Reprod Immunol* 1999;43:213-24.
- [22] Ellis, S.A.; Sargent, I.L.; Redman, W.G.; Mcmichael, A.J.; Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunol* 1986;59:595-601.
- [23] Le Bouteiller, P.; HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994;14:89-129.
- [24] King, A.; Burrows, T.; Loke, Y.W.; Human uterine natural killer cells. *Nat Immunity* 1996;15:41-52.
- [25] Le Bouteiller, P.; Solier, C.; Pröll, J.; Aguerre-Girr, M.; Fournel, S.; Lenfant, F.; Placental HLA-G expression *in vivo*: where and what? *Hum Reprod Up* 1999;5:223-33.
- [26] Hviid, T.V.; Sorensen, S.; Morling, N.; Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol* 1999;60:1237-44.
- [27] Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I.; A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nuc Acid Res* 1991;19:5444.
- [28] Silva, J. S.; Região reguladora, promotora e éxon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente. *Dissertação* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Parana 2009.
- [29] Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S.; Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary BioinformaticsOnline* 1:47-50.
- [30] Borgatti, M.; Rizzo, R.; Dal Canto, M.B.; Fumagalli, D.; Renzini, M.M.; Fadini, R.; Stignani, M.; Baricordi, O.R.; Gambari, R.; Release of sICAM-1 in oocytes and *in vitro* fertilized human embryos. *Plos One* 2008;3:e3970.

- [31] Jurisicova, A.; Casper, R.F.; Maclusky, N.J.; Mills, G.B.; Librach, C.L.; HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996;93:161-5.
- [32] Pfeiffer, K.A.; Rebmann, V.; Pässler, M.; Van Der Ven, K.; Van Der Ven, H.; Krebs, D.; Grosse-Wilde, H.; Soluble HLA levels in early pregnancy after *in vitro* fertilization. *Hum Immunol* 2000;6:559-64.
- [33] Hviid, T.V.F.; Hylenius, S.; Lindhard, A.; Christiansen, O.B.; Association between human leukocyte antigen-G and success of *in vitro* fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 2004;64:66-9.
- [34] Sipak-Szmigiel, O.; Ronin-Walknowska, E.; Cybulski, C.; Plonka, T.; Lubinski, J.; Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure. *Fol Histochem Cytobiol* 2007;45:137-41.
- [35] Sipak-Szmigiel, O.; Cybulski, C.; Wokotorczyk, D.; Lubinski, J.; Kurzawa, R.; Baczkowski, T.; Radwan, M.; Radwan, P.; Ronin-Walknowska, E.; HLA-G polymorphism and *in vitro* fertilization failure in a Polish population. *Tissue Antigens* 2009;79:348-52.
- [36] Sher, G.; Keskinetepe, L.; Fisch, J.D.; Acacio, B.A.; Ahlering, P.; Batzofin, J.; Ginsburg, M.; Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fert Steril* 2005;83:1410-3.
- [37] Yao, Y.Q.; Barlow, D.H.; Sargent, I.L.; Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol* 2005;175:8379-85.
- [38] Rebmann, V.; Switala, M.; Eue, I.; Schwahn, E.; Merzenich, M.; Grosse-Wilde, H.; Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of *in vitro* fertilized embryos. *Hum Immunol* 2007;68:251-8.

CAPÍTULO II

(Este capítulo segue as normas da revista Fertility Sterility, a qual o artigo foi submetido)

Running Title: HLA-G 5'UTR and 3'UTR polymorphism in reproduction

HLA-G regulatory haplotypes and implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatment

COSTA, CH¹; GELMINI, GF¹; WOWK, PF¹; MATTAR, SB¹; VARGAS, RG¹; ROXO, VMS¹; SCHUFFNER, A²; BICALHO, MG¹.

¹ Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), Brasil.

² Centro de Medicina Reprodutiva Conceber, Curitiba (PR), Brasil

CAPSULE

Analysis of 16 SNPs in the 5'UTR and a 14-bp ins/del in the 3'UTR of the *HLA-G* gene in couples who underwent assisted reproduction treatments revealed susceptibility and protective haplotypes.

ABSTRACT

The role of HLA-G in several clinical conditions related to reproduction has been investigated. Important polymorphisms have been found within the 5'UTR and 3'UTR regions of the HLA-G promoter. The aim of the present study was to investigate 16 SNPs in the 5'UTR and 14-bp insertion/deletion (ins/del) polymorphism located in the 3'UTR region of the *HLA-G* gene and its possible association with the implantation outcome in couples who underwent assisted reproduction treatments (ART). The case group was composed of 19 couples (n = 38) who underwent ART. Ninety-four couples (n = 188) with two or more term pregnancies composed the control group. The expectation-maximization algorithm was used

to determine the polymorphism haplotype frequencies of the *HLA-G* gene for both groups. Classifying the case/control groups according to sex revealed a *susceptibility haplotypes* (that direct couples to ART) associated with *HLA-G* alleles in case women compared with control women. In addition, a *protective haplotypes*, related to fertility, was present only in control men and absent in case men. The presence of the *HLA-G*01:01:02a* and *HLA-G*01:01:02b* alleles, as well as a 14-bp deletion, in both case women (*susceptibility haplotype*) and control men (*protective haplotype*) showed contrasting results indicative of a maternal effect. These results led us to suggest a contribution of the *HLA-G*01:01:02a* and *HLA-G*01:01:02b* alleles to the implantation outcome in couples who underwent ART.

KEYWORDS

14-bp ins/del, HLA-G regulatory region, human reproduction, protective haplotype, SNPs, susceptibility haplotype

INTRODUCTION

The *HLA-G* gene, described by Geraghty *et al.* (1), plays an important role in immune tolerance and was initially discovered at the maternal-fetal interface. Evidence suggests that the maternal-fetal tolerance observed in pregnancy may result from interactions between HLA-G and receptors expressed in the membrane or cytoplasm of the natural killer (NK) cells (2) present at the maternal-fetal interface.

This gene is codominantly expressed, and its exon-intron and 3'UTR structures are similar to other classical HLA class I genes; however, differences in the 3' end encode a shorter cytoplasmic tail (1, 3). Important polymorphisms are also present in the regulatory region (5'URR and 3'UTR) and are associated with *HLA-G* gene expression and protein levels regulation (4).

Moreover, the unusual feature of the cis-acting regulatory elements in the promoter region of *HLA-G* may determine their differential responsiveness to master transcriptional inducers of MHC class Ia genes (NF- κ B, IRF-1 and Class II transactivator). As a consequence, a tight transcriptional gene control and tissue-restricted expression favor the presence of HLA-G at the fetal-maternal interface during pregnancy. In fact, the *HLA-G* gene region that spans from position -1350 to -1100 in *HLA-G* 5' regulatory region includes

important regulatory loci, such as, the locus control region (LCR) and tissue specific regulatory element (TSRE) (5).

Additionally, it was suggested that a single nucleotide polymorphism (SNP) in position -725C/G/T in the 5'UTR with the presence of guanine may alter the methylation profile of CpG dinucleotides resulting in a modification of gene expression. Position -726 is methylated in the majority of cells bearing the -725G allele (5). This epigenetic modification may influence the binding of regulatory factors as IRF-1 (Interferon response factor-1) to ISRE (interferon specific regulation element) located around 10 base pairs 3' from the polymorphic position (6).

Furthermore, the 14-bp insertion/deletion (ins/del) polymorphism in exon 8 of the 3'UTR present in both the *HLA-G* gene and transcript may affect *HLA-G* gene expression, resulting in higher or lower levels of soluble HLA-G (sHLA-G). Low levels of sHLA-G have been associated with some pregnancy complications, such as recurrent spontaneous miscarriages and pre-eclampsia, as well as in vitro fertilization (IVF) implantation failure (7). The results of other studies have been contradictory regarding the association between *HLA-G* 14-bp ins/del polymorphisms and pregnancy complications (8 - 10).

On the basis of the hypothesis that the *HLA-G* 14-bp genotype plays a role in pregnancy outcome, several researchers have reported that homozygous genotypes for the 14-bp insertion sequence were more common in women with recurrent miscarriages and other pregnancy complications than in fertile controls. Table 1 reviews 17 studies that have reported on the 14-bp ins/del polymorphism in exon 8 of *HLA-G* and its association with various pregnancy complications. Out of five studies that focused on recurrent spontaneous abortion (RSA) (8, 9, 11 - 13), four reported a link with mRNA expression (14 - 17), four with preeclampsia (10, 18, 19), three with IVF treatment (20 - 22) and one with birth weight (23).

Therefore, the present study investigated 16 SNPs in the 5'UTR previously described by Hviid *et al.*, 1999 (24) and Ober *et al.*, 2003(5) and 14-bp ins/del polymorphism (25) located in the 3'UTR region of the *HLA-G* gene and its possible association with the implantation outcome in couples who underwent ART.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Our case group included 19 Euro-Brazilian couples undergoing ART due to difficulties in natural conception related to female or male fertility. The couples were mainly selected from the “Conceber - Centro de Medicina Reprodutiva” in the state of Parana, Southern Brazil, between October 2009 and October 2010. The exclusion criteria comprised female age > 35 years, endometriosis, anatomical abnormalities of the uterus, abnormal karyotypes, history of autoimmune disease, retrieved oocytes <3 and the existence of obstructive azoospermia in males.

The 94 control couples were voluntary participants, unrelated to the cases, with two or more children and without history of idiopathic miscarriages or other reproductive problems. These blood samples have been assembled since 1997 at the Laboratory of Immunogenetics and Histocompatibility (LIGH) of the Genetics Department, Federal University of Paraná UFPR (Brazil). The case and control couples were grouped according to ethnic, social and economic status.

The Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the UFPR (HC-UFPR) approved the study (CEP-HC n°037ext.019/2001-07), and all participants from both groups signed a free and informed consent form and completed a personal and occupational questionnaire.

HLA-G Genotyping

Peripheral blood DNA extraction was carried out with the salting out technique described by Lahiri and Nurnberger (26). PCR reactions included the following: Taq 1X buffer (70 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0.45 mM of each dNTP, 2 mM MgCl₂, 2 U Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 pM of each specific primer pair and 50 ng/μL of DNA.

Amplification of 16 SNPs in the 5'UTR of the *HLA-G* was performed in two distinct fragments, each one with the following primers: forward ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG, reverse GTGTGCCTTTGAATCCCGATGC, and forward CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC, reverse TGTGACTCTGTCTTGCAACCG,

resulting in 638 bp and 637 bp PCR products, respectively. The initial denaturation cycle was carried out at 96°C for 5 min; followed by 35 cycles at 96°C for 30 sec, 66°C for 30 sec and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. The resulting amplicon was purified with 10 U of Exonuclease I and 1 U Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Staufen, Germany) to remove excess of primers and dNTPs, followed by a sequencing reaction with ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA). Sequencing products were eluted by electrophoresis using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA). The primers used in the direct DNA sequencing were the same as the PCR amplification. All sequences obtained were aligned using SeqScape Software 2.5 version (Applied Biosystems, CA, USA) and compared to FASTA sequence obtained from Ensemble. After that each SNP detected was individually noted.

The 14bp ins/del polymorphisms primers were described by Hviid *et al.*, 2002 (11). The PCR protocol was performed as follows: denaturation at 96°C for 5 min; 35 cycles at 96°C for 30 sec, 64°C for 90 sec and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 5 min. Then, the PCR products were electrophoresed in a 2.5% agarose gel for 75 min at 100 V and stained with ethidium bromide to allow scoring of the three different genotypes. The results were confirmed by electrophoresis in an 8% nondenaturing polyacrylamide gel for 150 minutes at 270 V.

Statistical Analysis

Genotypic and allelic frequencies were determined by direct counting. The comparisons between samples (cases *vs.* controls; successes *vs.* failures in assisted reproduction treatment) were performed in 3x2 (G-test) and 2x2 (Fisher's exact test) contingency tables using the GENEPOP version 4.0.10 and BIOESTAT version 5.0 programs, respectively, with significance set at $p \leq 0.01$. Odds ratios were calculated using BIOESTAT 5.0 with 95% confidence intervals.

Estimation of the haplotype frequencies was performed with ARLEQUIN version 3.11. The expectation-maximization (EM) algorithm was used to determine the SNP haplotype frequencies in the 5'URR of HLA (1,000 bootstrap replicates) and the linkage disequilibrium values (27).

RESULTS

Initially we evaluated the 14-bp ins/del polymorphisms. This polymorphism was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium, $p \leq 0.05$ in the case and control groups. No significant differences ($p > 0.01$) were observed in the genotypic and allelic frequencies of the exon 8 14-bp ins/del polymorphism between the case group ($n = 38$) and the control group ($n = 188$). The distributions of the 14-bp ins/del genotypic and allelic frequencies in both sexes within each group were similar. No significant differences were observed in any of the performed comparisons (data not shown).

The case group ($n = 38$) was grouped according to ART outcome: success ($n = 12$) or implantation failure ($n = 26$). No differences were observed in the allelic or genotypic frequencies between the success and failure groups for different sexes within the groups (men vs. women) or between the groups (success women vs. failure women; success men vs. failure men).

We also estimated the most frequently haplotypes for 16 SNPs in the 5'UTR plus the 14-bp ins/del in the 3'UTR of the *HLA-G* gene (cut-off = 0.01) for both the case and control groups are shown in Table 2. Nine haplotypes were observed exclusively in the control group. The remaining 7 haplotypes were shared by both groups.

The haplotypic comparisons between the case and control groups revealed that Haplotypes 3 and 4 were absent in the case group and were only present in controls; thus, they were associated with protection, related to fertility. Haplotypes 2 and 5 showed higher frequencies in the case group compared with the control group and were associated with susceptibility, that direct couples to ART (Table 3).

Comparisons between groups according to sex revealed a higher frequency of Haplotype 2 (or the *susceptibility haplotype*) ($p = 0.003$) in case women when compared with control women. Haplotype 5 also showed a higher but not statistically significant frequency in case women ($p = 0.02$; level $P = 0.01$). In addition, Haplotype 3 showed a higher but not statistically significant frequency in control women ($p = 0.02$; level $P = 0.01$) (Table 3). Haplotype 3 (or the *protection haplotype*) was present and statistically significant only in control men and absent in case men ($p = 0.006$) (Table 3).

DISCUSSION

Population studies on the *HLA-G* 14-bp ins/del polymorphism have shown differences in allelic/genotypic frequencies among women. The +/+14-bp genotype is more frequent in Danish than in Chinese or Indian women (reviewed in 9). No differences were observed among the Brazilian Amerindian population (28). Analysis of the 14-bp ins/del in an urban Brazilian population revealed a profile similar to that described for a European Caucasian population due to European colonization in Brazil (29).

Our results did not demonstrate significant differences in the genotypic or allelic distribution between case and control group, in accordance with similar results observed by Thipathi *et al.* (8), Xue *et al.* (9) and Iversen *et al.* (10). On the other hand, Vargas *et al.* concluded that the +/-14-bp genotype was more frequent in a control group than in an RSA group but did not demonstrate any difference in the allelic level between groups (13).

Association studies relating *HLA-G* and its influence in reproductive processes described by several authors have shown contradictory results (Table 1). For some reproductive complications, such as infertility that requires ART (8) or pre-eclampsia (18), the +14-bp allele had no influence on the clinical outcome. By contrast, a higher frequency of the +14-bp allele has been observed in a group of RSA women (7, 9, 11) and in IVF patients (21).

Birth weight has also been associated with the presence/absence of the 14-bp sequence (30). A higher frequency of the +/+ 14-bp genotype in the fetus was observed in mothers women presenting with pre-eclampsia during pregnancy (16).

In the present study, haplotypic comparisons between the case and control groups showed that Haplotypes 3 and 4 were absent in the case group and only present in controls and were thus associated with protection. Similarly, Haplotypes 2 and 5 showed higher frequencies in the case group when compared with the control group and were associated with susceptibility (Tables 3). Furthermore, comparisons between groups according to sex revealed a higher frequency of Haplotype 2 (*susceptibility haplotype*) ($p = 0.003$; OR = 3.79; CI = 1.58-9.06) in case women compared with control women. Haplotype 5 also showed a higher but not statistically significant frequency in case women ($p = 0.02$), and Haplotype 3 showed a higher but not statistically significant frequency in control women ($p = 0.02$). A comparison of case men vs. control men revealed that Haplotype 3 (*protection haplotype*) was present and statistically significant only in control men and absent in case men ($p = 0.006$; OR = 0.14; CI = 0.01-1.10).

On the basis of these new findings, we aligned reported sequences of *HLA-G* promoter region alleles with those of the susceptibility/protection haplotypes, as shown in Table 4.

Aldrich *et al.* (31) reported that the presence of an *HLA-G*01:04* or *HLA-G*01:05N* allele in either partner was significantly associated with an increased risk of miscarriage after adjustment for maternal age, number of previous miscarriages, history of live birth and treatment with paternal mononuclear cells. The *G*01:05N* allele is defined by polymorphisms in the $\alpha 2$ domain and encodes protein variants that are present only in the fulllength HLA-G1 protein (32). Evidence suggests that allelic variation in the $\alpha 2$ domain of the HLA-G1 isoforms contributes to recurrent miscarriages (31).

Low levels of sHLA-G have been observed in the presence of *HLA-G*01:05N*. The allele *G*01:04:01* has been related to high serum levels of sHLA-G, such as *G*01:01*, whereas intermediate levels have been associated with alleles *G*01:01:08* and *G*01:04* (14, 33).

In the present study, we observed that the *HLA-G*01:01:02a* allele, which includes the *HLA-G*01:05N* allele and ins 14-bp in association with Haplotype 2, showed a significant, specific risk in case women ($p = 0.005$; OR = 3.79; CI = 1.58-9.06). In addition, the *HLA-G*01:04:01a* and *HLA-G*01:04:01b* alleles plus del 14-bp in association with Haplotype 5 also showed a specific risk in the same group ($p = 0.02$), which led us to suggest their contribution to couples seeking ART because of unexplained infertility. The *HLA-G*01:01:02a* allele plus del 14-bp in association with Haplotype 3 showed a nonsignificant Haplotype 3-specific protective effect in control women ($p = 0.02$). Interestingly, we observed that *HLA-G*01:01:02a* and *HLA-G*01:01:02b* plus del 14-bp associated with Haplotype 3 showed a significant protective effect in control men ($p = 0.006$; OR = 0.14; CI = 0.01-1.10).

The presence of the *HLA-G*01:01:02a* and *HLA-G*01:01:02b* alleles plus del 14-bp in both case women (*susceptibility haplotype*) and control men (*protective haplotype*) produced contrasting results, which led us to suggest a maternal effect associated with the *HLA-G*01:01:02a* and *HLA-G*01:01:02b* alleles that the mother provided to the developing embryo.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the research fund of FUNPAR- LIGH. We are most grateful to couples for generously accorded to provide samples for this study. We also thank Clínica Conceber and LIGH staff for technical support.

REFERENCES

1. Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9145-9.
2. van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. HLA-G polymorphisms and molecule function--questions and more questions--a review. *Placenta* 2000;21 Suppl A:S86-92.
3. Schmidt CM, Ehlenfeldt RG, Athanasiou MC, Duvick LA, Heinrichs H, David CS, *et al.* Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription. *J Immunol* 1993;151:2633-45.
4. Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. *Hum Immunol* 2006;67:53-62.
5. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, *et al.* Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am J Hum Genet* 2003;72:1425-35.
6. Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poeta S, Gourand L, *et al.* A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *J Biol Chem* 2001;276:6133-9.
7. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006;12:209-32.
8. Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004;64:706-10.
9. Xue S, Yang J, Yao F, Xu L, Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2007;69 Suppl 1:153-5.
10. Iversen AC, Nguyen OT, Tommerdal LF, Eide IP, Landsem VM, Acar N, *et al.* The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidua HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2008;78:158-65.
11. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002;60:122-32.
12. Yan WH, Lin A, Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, *et al.* Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2006;68:521-3.
13. Vargas RG, Sarturi PR, Mattar SB, Bompeixe EP, Silva JD, Pirri A, *et al.* Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14-bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples. *Hum Immunol* 2011; In Press:

14. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003;55:63-79.
15. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003;64:1005-10.
16. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008;72:335-41.
17. Gonzalez A, Alegre E, Torres MI, Diaz-Lagares A, Lorite P, Palomeque T, *et al.* Evaluation of HLA-G5 plasmatic levels during pregnancy and relationship with the 14-bp polymorphism. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:367-74.
18. Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 2004;10:237-46.
19. Vianna P, Dalmaz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JA. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 2007;68:668-74.
20. Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 2004;64:66-9.
21. Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004;56:135-41.
22. Sipak-Szmigiel O, Cybulski C, Wokolorczyk D, Lubinski J, Kurzawa R, Baczkowski T, *et al.* HLA-G polymorphism and in vitro fertilization failure in a Polish population. *Tissue Antigens* 2009;73:348-52.
23. Hviid TV. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. *Hum Immunol* 2004;65:586-93.
24. Hviid TV, Sorensen S, Morling N. Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene. *Hum Immunol* 1999;60:1237-44.
25. Harrison GA, Humphrey KE, Jakobsen IB, Cooper DW. A 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:2200.
26. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
27. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1:47-50.
28. Mendes-Junior CT, Castelli EC, Simoes RT, Simoes AL, Donadi EA. HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. *Tissue Antigens* 2007;69:255-60.
29. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Donadi EA. HLA-G alleles and HLA-G 14 bp polymorphisms in a Brazilian population. *Tissue Antigens* 2007;70:62-8.
30. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Barclay ML, Kennedy MA, Frampton CM, *et al.* Lack of association between HLA-G 14 bp insertion/deletion polymorphism and response to long-term therapy with methotrexate response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:154-5.
31. Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, *et al.* HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1167-72.

32. Van der Ven K, Ober C. HLA-G polymorphisms in African Americans. *J Immunol* 1994;153:5628-33.
33. Rebmann V, van der Ven K, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001;57:15-21.
34. Yie SM, Li LH, Xiao R, Librach CL. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008;14:649-53.
35. Larsen MH, Hviid TV. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum Immunol* 2009;70:1026-34.

Table 1: Review of studies on *HLA-G* and its influence in reproductive processes

Country	Process studied	<i>HLA-G</i> region study	Results
Denmark (11)	RSA	+14-bp/-14-bp exon 8	+/+14-bp genotype more frequent in female patients
Denmark (14)	<i>HLA-G</i> alleles and mRNA level in first-trimester trophoblast cells	<i>HLA-G</i> alleles and +14-bp/-14-bp exon 8	+14-bp allele associated with low <i>HLA-G</i> mRNA levels
France (15)	<i>HLA-G</i> mRNA level in JEG-3 choriocarcinoma and M8 melanoma cells	+14-bp/-14-bp exon 8	-14-bp allele associated with increased <i>HLA-G</i> mRNA stability
Denmark (18)	Pre-eclampsia	+14-bp/-14-bp exon 8	+/+14-bp fetal genotype associated with pre-eclampsia
Denmark (20)	IVF	+14-bp/-14-bp exon 8	+/+14-bp genotype associated with successful treatment
Denmark (23)	Birth weight	+14-bp/-14-bp exon 8	+/+14-bp genotype associated with higher birth weight
Denmark (21)	<i>HLA-G</i> isoforms G1 and G5 and IVF	5'URR and 3'UTR regions	Polymorphisms influenced sHLA-G expression
India (8)	RSA	+14-bp/-14-bp exon 8	NS
China (12)	RSA	+14-bp/-14-bp exon 8	+14-bp allele more frequent in female patients
China (9)	RSA	+14-bp/-14-bp exon 8	NS
Brazil (19)	Pre-eclampsia	+14-bp/-14-bp exon 8	-/-14-bp genotype conferred protection against pre-eclampsia
China (16)	sHLA-G expression	+14-bp/-14-bp exon 8	sHLA-G expression lower in +/+14-bp than -14-bp carrier
Norway (10)	Pre-eclampsia	+14-bp/-14-bp exon 8	NS
Canada (34)	Pre-eclampsia	3'-UTR region	Instability of mRNA associated with susceptibility to pre-eclampsia
Poland (22)	IVF	Promoter region and +14-bp/-14-bp exon 8	+/-14-bp genotype associated with IVF failure
Brazil (13)	RSA	+14-bp/-14-bp exon 8	+/+14-bp genotype more frequent in controls
Spain (17)	HLA-G5 level	+14-bp/-14-bp exon 8	+14-bp allele associated with the presence of the HLA-G5 isoform

IVF: in vitro fertilization

NS: not significant

RSA: recurrent spontaneous abortion

sHLA-G: soluble HLA-G

Table 2 Most frequently haplotypes plus 14-bp ins/del for 16 SNPs and their frequencies in the case (n = 38) and control (n = 76) groups.

	Haplotype																Case		Control		Total Freq.	
	-1306A/G	-1179G/A	-1155G/A	-1140T/A	-1138A/G	-1121C/T	-964A/G	-762T/C	-725C/G/T	-716G/T	-689G/A	-666T/G	-633A/G	-486C/A	-477G/C	-369A/C	14bp ins/del	Women	Men	Women		Men
1	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	del	0.021	0.028	0.071	0.1	0.22
2	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins	0.039	0.036	0.042	0.065	0.182
3	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del			0.045	0.063	0.108
4	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins			0.039	0.024	0.063
5	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del	0.018	0.012	0.015	0.016	0.061
6	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del	0.006	0.009	0.011	0.006	0.032
7	A	G	G	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins	0.006	0.003	0.01	0.009	0.028
8	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del	0.004		0.011	0.011	0.026
9	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins		0.003	0.01	0.011	0.024
10	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	ins			0.016	0.007	0.023
11	G	A	G	A	A	T	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins			0.009	0.01	0.019
12	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del			0.016	0.003	0.019
13	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins			0.006	0.007	0.013
14	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	del			0.012		0.012
15	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	C	C	del			0.003	0.008	0.011
16	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	G	A	del			0.01		0.01

Table 3: Haplotypic frequency comparison between case (n=76) and control (n=232) group, case women (n=38) and control women (n=116) group and case men (n=38) and control men (n=116).

		Case group				OR				OR				OR	
		+	-	Case group	Control group		(CI)	Case women	Control women		(CI)	Case men	Control men		(CI)
Hapl. 1		16	60	55	177	p=0.379		7	23	p=0.237		9	32	p=0.566	
								31	93			29	84		
Hapl. 2		25	51	36	196	p=0.001	2.66 1.47-4.84	13	14	p=0.003	3.79 1.58-9.06	12	22	p=0.083	
								25	102			26	94		
Hapl. 3		0	76	29	205	p=0.0002	0.09 0.01-0.67	0	12	p=0.029		0	17	p=0.006	0.14 0.01-1.10
								38	104			38	99		
Hapl. 4		0	76	16	216	p=0.009	0.16 0.2-1.28	0	10	p=0.053		0	6	p=0.1768	
								38	106			38	110		
Hapl. 5		10	66	10	222	p=0.010	3.42 1.36-8.57	6	5	p=0.027		4	5	p=0.068	
								32	111			34	111		
Hapl. 6		5	71	6	226	p=0.105		2	4	p=0.456		3	2	p=0.096	
								36	112			35	114		
Hapl. 7		3	73	6	226	p=0.389		2	3	p=0.339		1	3	p=0.635	
								36	113			37	113		
Hapl. 8		1	75	6	226	p=0.451		1	3	p=0.635		0	3	p=0.424	
								37	113			38	113		
Hapl. 9		1	75	6	226	p=0.451		0	3	p=0.424		1	3	p=0.635	
								38	113			37	113		
Hapl. 10		0	76	7	225	p=0.134		0	5	p=0.237		0	2	p=0.566	
								38	111			38	114		
Hapl. 11		0	76	6	226	p=0.180		0	3	p=0.424		0	3	p=0.424	
								38	113			38	113		
Hapl. 12		0	76	6	226	p=0.180		0	5	p=0.237		0	1	p=0.753	
								38	111			38	115		
Hapl. 13		0	76	4	228	p=0.320		0	2	p=0.566		0	2	p=0.566	
								38	114			38	114		
Hapl. 14		0	76	4	228	p=0.320		0	4	p=0.318		0	0		
								38	112			38	116		
Hapl. 15		0	76	3	229	p=0.426		0	1	p=0.753		0	2	p=0.566	
								38	115			38	114		
Hapl. 16		0	76	3	229	p=0.426		0	3	p=0.424		0	0		
								38	113			38	116		

Table 4: Haplotype described in this study compared with haplotypes described by Larsen and Hviid, 2009 (35)

	Haplotype																14bp ins/del
	-1306A/G	-1179G/A	-1155G/A	-1140T/A	-1138A/G	-1121C/T	-964A/G	-762T/C	-725C/G/T	-716G/T	-689G/A	-666T/G	-633A/G	-486C/A	-477G/C	-369A/C	
1	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	del
2	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
3	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
4	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins
5	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
6	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del
7	A	G	G	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
8	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
9	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins
10	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	ins
11	G	A	G	A	A	T	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
12	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del
13	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
14	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	del
15	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	C	C	del
16	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	G	A	del
<i>G*01:01:01a¹</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	Haplotype 1 and 4
<i>G*01:01:01b</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	
<i>G*01:01:01c</i>	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	Haplotype 12
<i>G*01:01:01d</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	Haplotype
<i>G*01:01:01e</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	1 and 4
<i>G*01:01:02</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		del Haplotype
<i>G*01:01:02</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins 11
<i>G*01:01:02a²</i>	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	Haplotype
<i>G*01:01:02b</i>	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	2 and 3
<i>G*01:01:03</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins
<i>G*01:03</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins Haplotype 11
<i>G*01:03</i>								T	T	T	A	A	G	A	G		ins
<i>G*01:03</i>								C	C	T	A	A	G	A	C		ins

<i>G*01:03</i>								C	T	T	A	A	G	A	C	ins
<i>G*01:03</i>								C	T	T	A	A	G	A	G	ins
<i>G*01:03:01a</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A
<i>G*01:03:01b</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A
<i>G*01:03:01c</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A
<i>G*01:03:01d</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A
<i>G*01:04:01a</i>	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A
<i>G*01:04:01b</i>	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A
<i>G*01:05N</i>								T	C	G	G	T	A	C	G	ins
<hr/>																
<i>G*01:01:01a¹: G*01:01:01: G*01:01:08; G*01:01:04</i>																
<i>G*01:01:02a²: G*01:01:02; G*01:02:03; G*01:05N and G*01:06:01</i>																

Haplotype

5

Haplotype

11

4. DISCUSSÃO

Na constante busca por aprimoramento das técnicas de reprodução assistida, com intuito de aumentar a taxa de sucesso implantacional, estudos atuais têm sinalizado sobre a importância da expressão do *HLA-G* na gestação. Juriscova *et al.*, em 1996, foram os primeiros a demonstrar que a expressão de *HLA-G* solúvel nos sobrenadantes de cultura de embriões resulta numa maior taxa de clivagem do embrião quando comparados a embriões não secretores de sHLA-G. Baseado neste estudo, outros pesquisadores iniciaram investigações relacionadas a *HLA-G* como biomarcador candidato para inferir ocorrências relacionadas à gestação. Além disso, investigou-se também a relação existente entre os diferentes alelos *HLA-G* com os níveis de expressão da proteína *HLA-G* no sobrenadante da cultura embrionária como auxiliar na etapa de seleção embrionária em TRA (PFEIFFER *et al.*, 2000; FUZZI *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004; NOCCI *et al.*, 2005; SHER *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2005; REBMANN *et al.*, 2007; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007; VERCAMMEN *et al.*, 2008; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2009; KOTZE *et al.*, 2010; REBMANN *et al.*, 2010).

Na região sul do Brasil, este foi o primeiro estudo identificando os 16 SNPs da região promotora 5'URR e o polimorfismo de ins/del de 14pb no exon 8 na região 3'UTR do gene *HLA-G* em casais submetidos a TRA e controles. Através da caracterização das variações genéticas e suas frequências alélicas, genótípicas e/ou haplotípicas entre os grupos investigados, foi possível traçar um perfil genético dos casais que recorrem a TRA, e o valor prognóstico dessa variação genética com o resultado do tratamento de reprodução assistida (sucesso ou insucesso) em casais com infertilidade de causas desconhecidas.

As frequências alélicas e genótípicas foram distintas quando comparados SNPs da região 5'URR entre os grupos, estando os alelos -1306A, -1179G e -1121C mais frequentes em casais submetidos a TRA, e os alelos -1138A e -964G nos controles ($p \leq 0,01$). Nos casais submetidos ao TRA os genótipos -1306G/G, -1179A/A e -1121C/T foram menos frequentes, enquanto os genótipos -1155G/G, -1138A/A e -964A/G apresentavam maior frequência no grupo controle ($p \leq 0,01$).

A comparação entre os sexos nos casais submetidos a TRA demonstrou similaridade entre mulheres e homens, enquanto a mesma comparação no grupo controle, uma importante diminuição da frequência do alelo -725C foi observada nas mulheres, mas não foi significativa.

Entre mulheres submetidas a TRA e mulheres controles observou-se uma menor frequência de alguns alelos e genótipos em mulheres submetidas a tratamento, sendo menos freqüente neste grupo os alelos -1306G, -1179A, -1121T, -964G, -762C, -716T, -689A, -666G e -486A, e os genótipos -1138G/G, -1179A/A, -964G/G, -762C/C, -716T/T, -689A/A e -486A/A quando comparadas as controles ($p \leq 0,01$). Esta mesma comparação entre o sexo masculino de cada grupo revelou o alelo -1179A menos freqüente e o alelo -1121T ausente em homens pacientes. Interessantemente, foi observada uma ausência do genótipo -1138G/G tanto em homens pacientes como controles.

Os estudos de Ober *et al.*, 2003 e Silva *et al.*, 2009 associam o SNP -725C/G/T com AER. No presente estudo não foi possível observar diferenças na frequência do SNP-725C/G/T entre pacientes e controles. A associação desta variante genética com o AER descrita em estudos anteriores permite propor que, decorrente de uma troca de bases nessa posição, na região promotora de *HLA-G*, a presença do alelo -725G poderia resultar em uma alteração no perfil de metilação dos dinucleotídeos CpG, uma vez que na posição -726 existe uma base C. Reporta-se que a maioria das células portadoras do alelo -725G apresentavam -726C metilado, o que poderia influenciar a ligação de IRF-1 no ISRE, localizado a aproximadamente 10 pares de bases da 3' dessa posição polimórfica (LEFEBVRE *et al.*, 1999; OBER *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo são sugestivos de que, além do já conhecido -725C/G/T, outros SNPs poderiam atuar com “tag SNP”, que são SNPs em desequilíbrio de ligação com determinada variação genética (outro SNP ou alelo), dentro da sequência regulatória de *HLA-G*. Ressalta-se que o controle da expressão de *HLA-G* envolve elementos regulatórios agindo em *cis/trans* e presentes em sua região promotora (entre as posições -1350 a +1), determinando sua resposta diferencial aos principais fatores transcricionais dos genes MHC de classe Ia (NF-kB, IRF-1 e o CIITA), bem como um controle transcricional e expressão tecido-específica. Na região 5'URR de *HLA-G* há importantes *loci* regulatórios, tais como o LCR e o TSRE (OBER *et al.*, 2003), e variações nas sequências desta região poderiam alterar sua ligação com fatores transcricionais específicos, impactando na regulação da expressão dos diferentes alelos de *HLA-G*.

A avaliação das frequências alélicas e genotípicas das variantes ins/del de 14pb do exon 8 de *HLA-G* não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das abordagens comparativas. A diferença entre populações já foi reportada para este polimorfismo, havendo estudos que apresentam resultados similares aos observados em nosso trabalho (TRIPATHI *et al.*, 2004; XUE *et al.*, 2007; IVERSEN *et al.*, 2008), bem como resultados discordantes que

revelam uma maior frequência do genótipo ins/ins 14pb em mulheres dinamarquesas comparadas a mulheres chinesas e indianas (revisado por YAN *et al.*, 2006a). Vargas e colaboradores, em 2011, relataram uma maior frequência de homozigotos para a variante ins14pb no grupo controle comparado com casais com relato de 3 ou mais AER.

Assim, os resultados sobre a influência de polimorfismos em regiões reguladoras de *HLA-G* e reprodução têm sido contraditórios. Em alguns estudos não se observou qualquer influência da variante ins14pb em TRA (TRIPATHI *et al.*, 2004) ou pré-eclampsia (IVERSEN *et al.*, 2008), enquanto outros relatam sua influência em AER (HVIID *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004a; YAN *et al.*, 2006a), em tratamentos de FIV (SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2009) e com o peso do recém nascido (HVIID *et al.*, 2004b). O genótipo ins/ins foi observado como mais freqüente em fetos de mulheres que desenvolveram pré-eclampsia (HYLENIUS *et al.*, 2004).

Existe uma taxa de sucesso associada aos tratamentos de reprodução assistida de cerca de 15 a 20%. Nossos resultados demonstraram que a relação entre as frequências alélicas e genotípicas com o resultado do tratamento de fertilidade não apresentou diferença significativa. Isso pode ser consequência do número reduzido de casais que tiveram um sucesso implantacional (n = 12), comparado com os casais que tiveram um insucesso do tratamento (n = 26).

Os dados de genotipagem dos 16 SNPs da região 5'URR analisados em conjunto com o polimorfismo de ins/del de 14pb, permitiu a estimativa de 16 haplótipos, sendo 9 exclusivamente presentes em indivíduos controles e 7 compartilhado entre ambos os grupos.

Das comparações haplotípicas foram referidos como associados com efeito de proteção a concepção natural os haplótipos 3 e 4, evidenciado por sua ausência nos casais submetidos a TRA e presença nos casais controle (p = 0,0002; OR = 0,09; IC = 0,01-0,067; e p = 0,009; OR = 0,16; IC = 0,2-1,28, respectivamente). Além disso, observou-se efeito de susceptibilidade associado aos haplótipos 2 e 5, que apresentaram uma maior frequência nos casais submetidos a TRA (p = ,001; OR = 2,66; IC = 1,47-4,84; e p = 0,01; OR = 3,42; IC = 1,36-8,57, respectivamente).

Análises comparativas das frequências haplotípicas foram realizadas considerando-se os grupos estratificados por sexo. Na comparação entre mulheres pacientes vs mulheres controles, o haplótipo 2 permaneceu significativamente diferente e mais freqüente nas pacientes submetidas a TRA (p = 0,003; OR = 3,79; IC = 1,58-9,06). O haplótipo 5, apesar de sugestivo aumento, não apresentou significância (p = 0,02). Um comportamento inverso, mais freqüente em mulheres controles foi observado com relação ao

haplótipo 3, que permaneceu próximo a significância ($p = 0,02$). Entre os homens, o único haplótipo que mostrou significância estatística foi o haplótipo 3, mais freqüente em homens controles do que nos pacientes ($p = 0,006$; OR = 0,14; IC = 0,01-1,10).

Com o auxílio do trabalho de Larsen and Hviid, 2009, pode-se inferir quais possíveis alelos estariam associados com os haplótipos já referenciados, que se apresentaram com freqüências significativas na comparação entre os grupos caso e controle. Dessa forma foi possível associar o haplótipo 2 e 3 aos alelos *HLA-G*01:01:02a* (*G*01:01:02*; *G*01:02:03*; *G*01:05N* e *G*01:06:01*) e *G*01:01:02b*; enquanto o haplótipo 4 estava associado aos alelos *HLA-G*01:01:01a* (*G*01:01:01*; *G*01:01:08*; *G*01:01:04*), *G*01:01:01d* e *G*01:01:01*; e o haplótipo 5 foi associado com *HLA-G*01:04:01a* e *G*01:04:01b*.

Após a descrição de Rebmann *et al.*, 2001 dos alelos *HLA-G* relacionando-os como baixos e altos secretores, Hviid *et al.*, em 2003, associaram os alelos baixo secretores com a presença da seqüência de 14pb no exon 8, reportando assim a importância deste polimorfismo para a regulação da expressão gênica de *HLA-G*. Em nosso estudo, observou-se que a única posição divergente entre os Haplótipos 2 e 3, é exatamente o polimorfismo (ins/del) no exon 8, onde o haplótipo de maior susceptibilidade (Haplótipo 2) é genotipado ins14pb nesta posição, e o haplótipo sugestivo de proteção (Haplótipo 3) apresenta o alelo del14pb, concordando com os resultados apresentados por Hviid *et al.*, 2003.

Aldrich *et al.* em 2001, reportaram a associação dos alelos baixo secretores *HLA-G*01:04* e/ou *HLA-G*01:05N* nos casais com risco aumentado a casos de ERA, sendo esses alelos presentes em nossos haplótipos de susceptibilidade. Estudos têm demonstrado que os níveis de sHLA-G no sobrenadante da cultura do embrião estão associados ao sucesso ou insucesso do tratamento (FUZZI *et al.*, 2002; NOCCI *et al.*, 2005; RIZZO *et al.*, 2007; SAGESHIMA *et al.*, 2007; SIPAK-SZMIGIEL *et al.*, 2007; RIZZO *et al.*, 2009b) sendo os alelos de baixa secreção sempre associado com o insucesso da reprodução. No entanto, nas comparações entre casais com sucesso e insucesso do TRA não encontramos diferenças significativas que corroborem os achados destes estudos.

Estudos similares com maior número amostral de casais submetidos a tratamento de reprodução devem ser realizados para confirmar os resultados do presente estudo. Além disso, estudos que investiguem fatores transcricionais e/ou epigenéticos associados com os SNPs e outros sítios reguladores investigados ampliariam os achados do presente trabalho.

5. CONCLUSÃO

- ✓ SNPs dentro da região LCR/TSRE apresentam distribuição distinta entre os casais TRA e os casais controles, demonstrando a importância dessa região para a expressão de *HLA-G* e sua relação com a concepção bem sucedida.
- ✓ No presente estudo foi possível inferir haplótipos de susceptibilidade/proteção a infertilidade envolvendo SNPs da região 5'URR e variantes ins/del14pb na região 3'UTR associados a alelos *HLA-G* descritos.
- ✓ O Haplótipo 2, inferido e associado ao alelo *HLA-G*01:01:02a* , que inclui os alelos *HLA-G*01:05N/ins14bp*, foi associado ao risco específico em mulheres em TRA.
- ✓ O Haplótipo 5 inferido e associado aos alelos *HLA-G*01:04:01a* e *HLA-G*01:04:01b/del14bp*, foi sugestivo de risco específico para o mesmo grupo de mulheres.
- ✓ O Haplótipo 3, inferido e associado ao *HLA-G*01:01:02a/del14bp* foi sugestivo de um efeito de proteção a infertilidade em mulheres controle.
- ✓ O Haplótipo 3 inferido e associado aos alelos *HLA-G*01:01:02a* e *HLA-G*01:01:02b/del14bp* mostrou um efeito protetor a infertilidade em homens da amostra controle.
- ✓ Os resultados contrastantes relacionados à presença do Haplótipo 3 associado aos alelos *HLA-G*01:01:02a* e *HLA-G*01:01:02b/del14bp* em mulheres submetidas a TRA (*haplótipo de susceptibilidade* a infertilidade) e em homens controle (*haplótipo de proteção* a infertilidade) nos permite sugerir efeito materno na herança dos alelos *HLA-G*01:01:02a* e *HLA-G*01:01:02b/del 14bp* em casais que recorreram ao auxílio de reprodução assistida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; AGRAWAL, S.; **Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions.** Eur J Immunogenet, vol. 31, pp. 275, 2004.

ABBAS, A.; JAVED, S.; AGRAWAL, S.; **Transcription status of HLA-G at the maternal – fetal interface in recurrent spontaneous abortion.** Int J Gynecol Obst, vol. 93, pp. 148, 2006.

AGRAWAL, S.; PANDEY, M.K.; **The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus.** J Hemat Stem Cell Res, vol. 12, pp. 749, 2003.

ALDRICH, C.L.; STEPHENSON, A.D.; KARRISON, T.; ODEM, R.R.; BRANCH, D.W.; SCOTT, J.R.; SCHEREIBER, J.R.; OBER, C.; **HLA-G genotypes outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage.** Mol Hum Rep, vol. 70, n. 12, pp. 1167-1172, 2001.

ASLAN, D.; ELIZUR, S.E.; LEVRON, J.; SHULMAN, A.; LERNER-GEVA, L.; BIDER, D.; DOR, J.; **Comparison of zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, vol. 122, pp. 191-194, 2005.

BENS DORP, A.J.; COHLEN, B.J.; HEINEMAN, M.J.; VANDEKERCKHOVE, P.; **Intra-uterine insemination for male subfertility.** Cochrane Database Syst Rev, vol.18, pp. CD000360, 2007.

BENSUSSAN, A.; MANSUR, I.G.; MALLET, V.; RODRIGUES, A.M.; GURR, M.; WEISS, E.H.; BREM, G.; BPUMSELL, L.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; LEBOUTEILLER, P.; **Detection of membrane-bound HLA-G translated products with a specific monoclonal antibody.** Proc Natl Acad Sci USA, vol. 92, pp. 10292, 1995.

BJORKMAN, P.J.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W.S.; STROMINGER, J.L.; WILEY, D.C.; **The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.** Nature, vol. 329, pp. 512, 1987.

BLAKE D.; FARGUHAR, C.M.; JOHNSON, N.; PROCTOR, M.; **Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception.** Cochrane Database Syst Rev, vol. 4, pp. CD002118, 2007.

BLANCHET, O.; BOURGE, J.F.; ZINSZER, H.; ISRAEL, A.; KOURILSKY, P.; DAUSSET, J.; DEGOS, L.; PAUL, P.; **Altered binding of regulatory factors to HLA class**

I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. Proc Natl Acad Sci USA, vol 89, pp. 3488, 1992.

BLASCHITZ, A.; JUCH, H.; VOLZ, A.; HUTTER, H.; DAXBOECK, C.; DESOYE, G.; DOHR, G.; **The soluble pool of HLA-G produced by human trophoblasts does not include detectable levels of the intron 4-containing HLA-G5 and HLA-G6 isoforms.** Mol Hum Reprod, vol. 11, pp. 699, 2005

BOHJANEN, P.R.; PETRYNIAK, B.; JUNE, C.H.; THOMPSON, C.B.; LINDSTEN, T.; **An inducible cytoplasmic factor (AU-B) binds selectively to AUUUA multimers in the 3'utr of lymphokine mRNA.** Mol Cell Biol, vol. 11, pp. 3288, 1991.

BOOMSMA CM, HEINEMAN MJ, COHLEN BJ, FARQUHAR C. **Semen preparation techniques for intrauterine insemination (Review).** Cochrane Database Syst Rev, Art No.: CD004507, doi:10.1002/14651858,CD004507.pub3, 2007.

BORGATTI, M.; RIZZO, R.; DAL CANTO, M.B.; FUMAGALLI, D.; RENZINI, M.M.; FADINI, R.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R.; GAMBARI, R.; **Release of sICAM-1 in oocytes and *in vitro* fertilized human embryos.** Plos One, vol. 3, pp. e3970, 2008.

BOSS, JM.; **Regulation of transcription of MHC class II genes.** Curr Opin Immunol, vol. 9, pp. 107, 1997.

BRONSON, R.A.; **Sperm antibodies.** Immunol Allerg Clin North Am, vol. 10, pp. 165-184, 1990.

CARROLL, M.C.; CAMPBELL, R.D.; PORTER, R.R.; **Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man.** Proc Natl Acad Sci USA, vol.82, pp. 521, 1985.

CASTELLI, E.C.; MOREAU, P.; OYA E CHIROMATZO, A.; MENDES-JÚNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; GIULIATTI, S.; CAROSELLA, E.D.; CONADI, E.A.; **In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes.** Hum Immunol, 2009, doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.028.

CHEN, X.Y.; YAN, W.H.; LIN, A.; XU, H.H.; ZHANG, J.G.; WANG, X.X.; **The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma.** Tissue Antigens, vol. 72, pp. 335, 2008.

CHUA, J.H.; ARGUGAM, A.; JEYASEELAN, K.; **MicroRNAs: biogenesis, function and applications**. Curr Opin Mol Ther, vol. 11, n. 2, pp. 189, 2009.

DIEHL, M.; MÜNZ, C.; KEILHOLZ, W.; STEVANOVIC, S.; HOLMES, N.; LOKE, Y.W.; RAMMENSEE, H.G.; **Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters**. Curr Biol, vol. 6, pp. 305, 1996.

ELLIS, S.A.; SARGENT, I.L.; REDMAN, W.G.; MCMICHAEL, A.J.; **Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line**. Immunology, vol. 59, pp. 595, 1986.

ELLIS, S.A.; PALMER, M.S.; MCMICHAEL, A.J.; **Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule**. J Immunol, vol. 144, pp. 731, 1990.

ENSEMBLE, disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>, acessado em janeiro 2011.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S.; **Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis**. Evolutionary BioinformaticsOnline vol. 1, pp. 47-50.

FANCHIN, R.; GALLOT, V.; ROUAS-FREISS, N.; FRYDMAN, R.; CAROSELLA, E.D.; **Implication of HLA-G in human embryo implantation**. Hum Immun, vol. 68, pp. 259-63, 2007.

FUZZI, B.; RIZZO, R.; CRISCUOLI, L.; NOCI, I.; MELCHIORRI, L.; SCARSELLI, B.; BENCINI, E.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; **HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy**. Eur J Immunogenet, vol. 32, pp. 311, 2002.

GAO, G.F.; TORMO, J.; GERTH, U.C.; WYER, J.R.; MCMICHAEL, A.J.; STUART, D.I.; BELL, J.I.; JONES, Y.E.; JAKOBSEN, B.K.; **Crystal structure of the complex between human CD8 α - α and HLA-A2**. Nature, vol. 387, pp. 630, 1997.

Genbank, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, acessado em janeiro 2011.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T.; **A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment**. Proc Nat Acad Sci USA, vol. 84, pp. 9145, 1987.

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; KEIJSERS, V.; VAN DER ELSE, P.; **Site a is crucial for two routes of IFN γ -induced MHC class I transactivation: The ISRE-mediate route and a novel pathway involving CIITA.** Immunity, vol. 6, pp. 601, 1997a.

GOBIN, S.J.P.; KEIJSERS, V.; WOLTMAN, A.M.; PEIJNENBURG, A.; WILSON, L.; VAN DEN ELSE, P.J.; **Locus-specific regulation of HLA class I gene expression.** In.: D. Charron (ed): Genetic diversity of HLA. Func Med Implic vol. 2, pp. 295, 1997b.

GOBIN, S.J.P.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.; VAN ZUTPLHEN, M.; VAN DEN BERG, R.; VAN DEN ELSE, P.J.; **The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA mediated transactivation of MHC class I and β_2m genes.** Immunity, vol 9, pp. 531, 1998.

GOES, N.; SIMS, T.; URMSON, J.; VINCENT, D.; RAMASSAR, V.; HALLORAN, P.F.; **Disturbed MHC regulation in de INF- γ knouckout mouse. Evidence for three states of MHC expression with distinct roles for INF- γ .** J Immunol, vol. 155, pp. 4559, 1995.

GOLDBERG, J.M.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; **In vitro fertilization update.** Cleveland Clinic J Med, vol. 74, pp. 329-38, 2007.

HARRISON, G.A.; HUMPHREY, K.E.; JAKOBSEN, I.B.; COOPER, D.W.; **A 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene.** Hum Mol Genet, vol. 2, pp. 2200, 1993.
HLA nomenclature, disponível em: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, acessado em janeiro de 2011.

HOBART, M.; RAMASSAR, V.; GOES, N.; URMSON, J.; HALLORAN, P.F.; **INF regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes *in vivo*.** J Immunol, vol 158, pp. 4260, 1997.

HUNT, J.S.; JADHAV, L.; CHU, W.; GERAGHTY, D.E.; OBER, C. **Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy.** Am J Obstet Gynecol, v. 183, pp. 682, 2000.

HVIID, T.V.; SORENSEN, S.; MORLING, N.; **Polymorphism in the regulatory region located more than 1.1 kilobases 5' to the start site of transcription, the promoter region, and exon 1 of the HLA-G gene.** Hum Immunol, vol. 60, pp. 1237, 1999.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A.M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O.B.; **HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions.** Tissue Antigens, vol. 60, pp. 122, 2002.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RORBYE, C.; NIELSEN, L.G.; **HLA-G variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels.** Immunogenetics, vol. 55, pp. 63, 2003.

HVIID, T.V.F.; HYLENIUS, S.; LINDHARD, A.; CHRISTIANSEN, O.B.; **Association between human leukocyte antigen-G and success of *in vitro* fertilization and pregnancy outcome.** Tissue Antigens, vol. 64, pp. 66, 2004a.

HVIID, T.V.; **HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth.** Hum. Immun, vol. 65, pp.586, 2004b.

HVIID, T.V.; RIZZO, R.; CHRISTIANSEN, O.B.; MELCHIORRI, L.; LINDHARD, A.; BARICORDI, O.R.; **HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms.** Immunogenetics, vol. 56, pp. 135, 2004c.

HVIID, T.V.F.; CHRISTIANSEN, O.B.; **Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G – Possible implications for human reproduction and autoimmune disease.** Hum Immunol, vol. 66, pp. 688, 2005.

HVIID, T.V.F.; **HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications.** Hum Reprod Up, vol. 12, pp. 209, 2006.

HVIID, T.V.F.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; BARICORDI, O.R. **Polymorphism in the 5'upstream regulatory and 3'unstrated region of the HLA-G in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression.** Hum Immunol, v. 67, p. 53, 2006.

HYLENIUS, S.; ANDERSEN, A.M.; MELBYE, M.; HVIID, T.V.; **Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads.** Mol. Hum Reprod, vol. 10, pp. 237, 2004.

IMBRAIM, E.C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibilityHLA-G gene in tumor cell lines.** Cell Stress & Chaperones, vol. 5, pp. 207-218, 2000.

IMGT/HLA *Database* , disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>, acessado em janeiro de 2011.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition.** J Immunol, vol. 171, pp. 1376, 2003.

IVERSEN, A.C.; NGUYEN, O.T.D.; TOMMERDAL, L.F.; EIDE, I.P.; LANDSEM, V.M.; ACAR, N.; MYHRE, R.; KLUNGLAND, H.; AUSTGULEN, R.; **The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidua HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies.** J Reprod Immunol, vol. 78, pp. 158, 2008.

JURISICOVA, A.; CASPER, R.F.; MACLUSKY, N.J.; MILLS, G.B.; LIBRACH, C.L.; **HLA-G expression during preimplantation human embryo development.** Proc Nat Acad Sci USA, vol. 93, pp. 161, 1996.

KAHN, J.A.; VON DURING, V.; SUNDE, A.; SORDAL, T.; MOLNE, K.; **Fallopian tube sperm perfusion: first clinical experience.** Hum Reprod, vol. 7, pp. 19-24, 1992.

KENNEDY, S.; BERGQVIST, A.; CHAPRON, C.; D'HOOGHE, T.; DUNSELMAN, G.; GREB, R.; HUMMELSHOJ, L.; PRENTICE, A.; SARIDOGAN, E.; **ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis.** Hum Reprod, vol. 20, pp. 2698-2704, 2005.
KING, A.; BURROWS, T.; LOKE, Y.W.; **Human uterine natural killer cells.** Nat Immunity, vol. 15, pp. 41, 1996.

KOTZE, D.J.; HANSEN, P.; KESKINTEPE, L.; SNOWDEN, E.; SHER, G.; KRUGER, T.; **Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome.** J Assist Reprod Genet, vol. 27, pp. 309-16, 2010.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R.; **A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast.** Science, vol. 248, pp. 220, 1990.

KULIEV, A.; VERLINSKY, Y.; **Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications.** Reprod Biomed Online, vol. 16, pp. 532-538, 2008.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I.; **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acid Res, vol. 19, pp. 5444, 1991.

LAMM, L.U.; OLAISEN, B.; **Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 5 and 6.** Cytogenet Cell Genet, vol. 40, pp. 128, 1985.

LARSEN, M.H.; HVIID, T.V.; **Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 1026-1034, 2009.

LE BOUTEILLER, P.; **HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions.** Crit Rev Immunol, vol. 14, pp. 89, 1994.

LE BOUTEILLER, P.; LENFANT, F.; **Antigen-presenting functions of the non-classical HLA-E,-F and -G class I molecules: the beginning of a story.** Res Immunol, vol. 147, pp.301, 1996.

LE BOUTEILLER, P.; BLASCHITZ, A.; **The functionality of HLA-G is emerging.** Immunol Rev, vol. 167, pp. 233, 1999.

LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PRÖLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F.; **Placental HLA-G expression *in vivo*: where and what?** Hum Reprod Up, vol. 5, pp. 223, 1999.

LEFEBVRE, S.; MOREAU, P.; GUIARD, V.; IBRAHIM, E.C.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types.** J Reprod Immunol, vol. 43, pp. 213, 1999.

LEE, N.; MALACKO, A.R.; ISCHITANI, A.; CHEN, M.C.; BAJORATH, J.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E.; **The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association.** Immunity, vol. 3, pp. 591, 1995.

LEVRAN, D.; FARHI, J.; NAHUM, H.; ROYBURT, M.; GLEZERMAN, M.; WEISSMAN, A.; **Prospective evaluation of blastocyst stage transfer vs zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure.** Fertil Steril, vol. 77, pp. 971-977, 2002.

LEVENS, E.D.; WHITCOMB, B.W.; PAYSON, M.D.; LARSEN, F.W.; **Ovarian follicular flushing among low-responding patients undergoing assisted reproductive technology.** Fertil Steril, vol. 91, pp. 1381-84, 2009.

LOMBARDO, F.; GANDINI, L.; LENZI, A.; DONDERO, F.; **Anti-sperm immunity in assisted reproduction.** J Reprod Immunol, vol. 62, pp. 101-109, 2004.

MEHRA, N.K.; KAUR, G.; **Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region.** Exp Rev Mol Med, vol. 4, pp. 1, 2003.

MILKI, A.A.; JUN, S.H.; HINCKLEY, M.D.; BEHR, B.; GIUDICE, L.C.; WESTPHAL, L.M.; **Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer.** Fertil Steril, vol. 79, pp. 503-506, 2003.

Milki AA, Jun SH, Hinckley MD, Behr B, Giudice LC, Westphal LM.

MORALES, P.J.; PACE, J.L.; PLATT, J.S.; LANGAT, D.K.; HUNT, J.S.; **Synthesis of beta(2)-microglobulin-free, disulphide-linked HLA-G5 homodimers in human placental villous cytotrophoblast cells.** Immunol, vol. 122, pp. 179-188, 2007.

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D.; PAUL, P.; **IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes.** Int Immunol, vol. 11, pp. 803, 1999.

MORENO, C.; EMERY, P.; WEST, J.E., DURAND,B., REITH,W., MACH,B., AND BOSS,M.; **Purified X2 binding protein (X2BP) cooperatively binds the class II MHC X box region in the presence of purified RFX, the X box factor deficient in the Bare Lymphocyte Syndrom.** J. Immunol., vol. 155, pp. 4313, 1995.

NAVARRO, F.; LLANO, M.; BELLON, T.; COLONNA, M.; GERAGHTY, D.E.; LOPEZ-BOTET, M.; **The ILT-2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 e HLA-E molecules co-expressed on target cells.** Eur J Immunol, vol. 29, pp. 277, 1999.

NAVARRO, J.; GARRIDO, N.; REMOH&IACUTE, J.;PELLICER, A.; **How does endometriosis affect ingertility?** Obstet Gynecol Clin North Am, vol. 30, pp. 181-192, 2003.

NELSON, N.; MARKS, M.S.; DRIGGERS, P.H.; OZATO, K.; **Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription.** Mol Cell Biol, vol. 13, pp. 588, 1993.

NOCCI, I.; FUZZI, B.; RIZZO, R.; MELCHIORRI, L.; CRISCUOLI, L.; DABIZZI, S.; BIAGIOTTI, R.; PELLEGRINI, S.; MENICUCCI, A.; BARICORDI, O.R.; **Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos.** Hum Reprod, vol. 20, pp. 138, 2005.

OBER, C.; ALDRICH, C.; ROSINSKY, B.; ROBERTSON, A.; WALTER, M.A.; WILLADSEN, S.; VERP, M.S.; GERAGHTY, D.E.; **HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival.** Placenta, vol. 19, pp. 127, 1998.

OBER, C.; ALDRICH, C.L.; CHERVONEVA, I.; BILLSTRAND, C.; RAHIMOV, F.; GRAY, H.L.; HYSLOP, T.; **Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.** Am J Hum Genet, vol. 72, pp. 1425, 2003.

PANDIAN, Z.; BHATTACHARYA, S.; VALE, L.; TEMLETON, A.; **In vitro fertilization for unexplained subfertility.** Cochrane Database Syst Rev, vol 18, pp. CD003357, 2005.

PAULI, S.A.; BERGA, S.L.; SHANG, W.; SESSION, D.R.; **Current status of the approach to assisted reproduction.** Pediatric Clin N Am, vol. 56, pp. 467-488, 2009.

PFEIFFER, K.A.; REBMANN, V.; PÄSSLER, M.; VAN DER VEN, K.; VAN DER VEN, H.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H.; **Soluble HLA levels in early pregnancy after *in vitro* fertilization.** Hum Immunology, vol. 6, pp. 559, 2000.

RAGNI, G.; SOMIGLIANA, E.; VEGETTI, W.; **Timing of intrauterine insemination: where are we?** Fertil Steril, vol 82, pp. 25-26, 2004.

REBMANN, V.; PFEIFFER, K.; PÄBLER, M.; FERRONE, S.; MAIER, S.; WEISS, E.; GROSSE-WILDE, H.; **Detection of soluble HLA-G molecules in plasma and amniotic fluid.** Tissue Antigens, vol. 53, pp. 14, 1999.

REBMANN, V.; VAN DER VEN, K.; PÄBLER, M.; PFEIFFER, K.; KREBS, D.; GROSSE-WILDE, H.; **Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles.** Tissue Antigens, vol. 57, pp. 15, 2001

REBMANN, V.; SWITALA, M.; EUE, I.; SCHWAHN, E.; MERZENICH, M.; GROSSE-WILDE, H.; **Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of *in vitro* fertilized embryos.** Hum Immunol, vol. 68, pp.251, 2007.

REBMANN, V.; SWITALA, I.; EUE, I.; GROSSE-WILDE, H.; **Soluble HLA-G is na independent factor for the prediction of pregnancy out come after ART: a German multi-center study.** Hum Reprod, vol. 25, pp. 1691-98, 2010.

RIENZI, I.; UBALDI, F.; IACOBELLI, M.; ROMANO, S.; MINASI, M.G.; FERRERO, S.; SAPIENZA, F.; BARONI, E.; GRECO, E.; **Significance of morphological attributes of the early embryo.** Reprod Biomed Online, vol. 10, pp. 669-681, 2005.

RIZZO, R.; FUZZI, B.; STIGNANI, M.; CRISCUOLI, L.; MELCHIORRI, L.; DABIZZI, S.; CAMPIONI, D.; LANZA, F.; MARZOLA, A.; BRANCONI, F.; NOCCI, I.; BARICORDI, O.R.; **Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF?** J Reprod Immunol, vol. 74, n. 1-2, pp. 133-142, 2007.

RIZZO, R.; STIGNANI, M.; MELCHIORRI, L.; BARICORDI, O.R.; **Possible role of human leukocyte antigen-G molecules in human oocyte/embryo secretome.** Hum Immunol, vol. 70, pp. 970-975, 2009a.

RIZZO, R.; DAL CANTO, M.B.; STIGNANI, M.; FADINI, R.; FUMAGALLI, D.; RENZINI, M.M.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R.; BARICORDI, O.R.; **Production of sHLA-G molecules by in vitro matured cumulus-oocyte complex.** Int J Mol Med, vol. 24, n. 4, pp. 523-530, 2009b.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; **The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability.** Hum Immunol, vol. 64, pp. 1005, 2003.

SABATIER, C.; GIMENEZ, C.; CALIN-LAURENS, V.; RABOURDIN-COMBE, C.; TOURAINE, J-L.; **Type III lymphocyte syndrome: lack of HLA class II gene expression and reduction in HLA class I gene expression.** Curr Res Acad Sci, vol. 319, pp. 789, 1996.

SAGESHIMA, N.; SHOBU, T.; AWAI, K.; HASHIMOTO, H.; YAMASHITA, M.; TAKEDA, N.; ODAWARA, Y.; NAKANISHI, M.; HATAKE, K.; ISHITANI, A.; **Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: a reassessment of sHLA-G detection methods.** J Reprod Immunol, vol.75, n. 1, pp. 11-22, 2007.

SCHMIDT, C.M.; EHLENFELDT, R.G.; ATHANASIOU, M.C.; DUVICK, L.A.; HEINRICHS, H.; DAVID, C.S.; ORR, H.T.; **Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice – evidence for a appositive region located 1kb 5' to the start site of transcription.** J Immunol, vol. 151, pp. 2633, 1993.

SHER, G.; KESKINTEPE, L.; FISCH, J.D.; ACACIO, B.A.; AHLERING, P.; BATZOFIN, J.; GINSBURG, M.; **Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer.** Fert Steril, vol. 83, pp. 1410, 2005.

SILVA, J.S.; **Região reguladora, promotora e éxon 4 de HLA-G em casais com histórico de abortamento recorrente.** *Dissertação* apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2009.

SIPAK-SZMIGIEL, O.; RONIN-WALKNOWSKA, E.; CYBULSKI, C.; PLONKA, T.; LUBINSKI, J.; **Antigens HLA-G, sHLA-G and sHLA-class I in reproductive failure.** Folia Histochem Cytobiol, vol. 45, pp. 137, 2007.

SIPAK-SZMIGIEL, O.; CYBULSKI, C.; WOKOTORCZYK, D.; LUBINSKI, J.; KURZAWA, R.; BACZKOWSKI, T.; RADWAN, M.; RADWAN, P.; RONIN-WALKNOWSKA, E.; **HLA-G polymorphism and *in vitro* fertilization failure in a Polish population.** Tissue Antigens, vol. 79, pp. 348, 2009.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G.; **Birth after the reimplantation of a human embryo.** Lancet, vol. 2, pp. 366, 1978.

TAN, Z.; RANDALL, G.; FAN, J.; CAMORETTI-MERCADO, B.; BROCKMAN-SCHNEIDER, R.; PAN, L.; SOLWAY, J.; GERN, J.E.; LEMANSKE, R.F.; NICOLAE, D.; OBER, C.; **Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma.** Am J Hum Genet, vol. 81, pp. 829, 2007.

TAN, C.Y.; HO, J.F.V.; CHONG, Y.S.; LOGANATH, A.; CHAN, Y.H.; RAVICHANDRAN, J.; LEE, C.G.; CHONG, S.S.; **Paternal contribution of HLA-G*0106 significantly increases risk for pré-eclampsia in multigravid pregnancies.** Mol Hum Reprod, vol. 14, pp. 317, 2008.

THANOS, D.; MANIATIS, T.; **NF- κ B: a lesson in family values.** Cell, vol. 80, pp. 529, 1995.

THESSALONIKI ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. **Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome.** Fertil Steril, vol. 89, pp. 505-522, 2008.

TRIPATHI, P.; ABBAS, A.; NAIK, S.; AGRAWAL, S.; **Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy.** Tissue Antigens, vol. 64, pp. 706, 2004.

TROWSDALE, J.; **Genetics and polymorphism: class II antigens.** Br Med Bull, vol. 43, pp. 15, 1987.

VAN DEN ELSEN, P.J.; PEIJNENBURG, A.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; GOBIN, S.J.P.; **Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes.** Immunology Today, vol. 19, n. 7, pp. 308, 1998a.

VAN DEN ELSEN, P.J.; GOBIN, S.J.P.; VAN EGGERMOND, M.C.J.A.; PEIJNENBURG, A.; **Regulation of MHC class I and class II genes transcription: differences and similarities.** Immunogenetics, vol. 48, pp. 208, 1998b.

VAN DER VEN, K.; OBER, C.; **HLA-G polymorphisms in African Americans.** J Immunol, vol. 153, pp. 5628, 1994.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S; **HLA-G polymorphisms and molecule function – questions and more questions – a review.** Placenta, vol. 21, pp. 86, 2000.

VAN LIEROP, M.J.; WINANDS, F.; LEKE, Y.W.; EMMER, P.M.; LUKASSEN, H.G.; VAN DER BRAAT, D.D.M.A.; MOSSELMAN, S.; JOOSTEN, J.; **Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B.** Mol Hum Reprod, vol. 8, pp. 776, 2002.

Vargas RG, Sarturi PR, Mattar SB, Bompeixe EP, Silva JD, Pirri A, *et al.* **Association of HLA-G alleles and 3' UTR 14-bp haplotypes with recurrent miscarriage in Brazilian couples.** Hum Immunol 2011; In Press:

VEECK, L.L.; **An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology.** New Yorl: Parthenon Pub. Group 1999.

VELA, G.; LUNA, M.; SNADLER, B.; COPPERMAN, A.B.; **Advances and controversies in assisted reproductive technology.** Mount Sinai J Med, vol. 76, pp. 506-520, 2009.

VERCAMMEN, M.J.; VERLOES, A.; VAN DE VELDE, H.; HAENTJENS, P.; **Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility: meta-analysis.** Hum Reprod Up, vol. 14, pp. 209, 2008.

VERKAUF, B.S.; **The incidenc, symptoms and signs of endometriosis in fertile and infertile women.** J Fla Med Assoc, vol. 74, pp. 671-675, 1987.

VIANNA, P.; DALMÁZ, C.A.; VEIT, T.D.; TEDOLDI, C.; ROISENBERG, I.; CHIES, J.A.B.; **Immunogenetics of pregnancy: Role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women.** Hum. Immunol, vol. 68, pp. 668, 2007.

XUE, S.; YANG, J.; YAO, F.; XU, L.; FAN, L.; **Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/114 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population.** Tissue Antigens, vol. 69, pp. 153, 2007.

YAMAMOTO, A.; MIZUKAMI, Y.; SAKURAI, H.; **Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*.** J Biol Chem, vol. 280, pp. 11911-19, 2005.

YAN, W.H.; LIN, A.; CHEN, X.J.; DAI, M.Z.; GAN, L.H.; ZHOU, M.Y.; ZHU, M.; SHI, W.W.; LIU, J.M.; **Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions.** *Tissue Antigens*, vol. 68, pp. 521, 2006a.

YAN, W.H.; FAN, L.A.; YANG, J.Q.; XU, L.D.; GE, Y.; YAO, F.J.; **HLA-G polymorphism in a Chinese Han population with recurrent spontaneous abortion.** *Int J Immunogenet*, vol. 33, pp. 55, 2006b.

YAO, Y.Q.; BARLOW, D.H.; SARGENT, I.L.; **Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses.** *J Immunol*, vol. 175, pp. 8379, 2005.

YIE, S.M.; LI, L.H.; XIAO, R.; LIBRACH, C.L.; **A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pré-eclampsia.** *Mol Hum Reprod*, vol. 14, pp. 649, 2008.

WARNER, C.M.; TYAS, D.A.; GOLDSTEIN, C.; COMISKEY, M.; COHEN, J.; BRENNER, C.A.; **Genotyping: the HLA system and embryo development.** *Reprod Biomed On*, vol. 4, pp. 133, 2002.

WARNER, C.M.; LAMPTON, P.W.; NEWMARK, J.A.; COHEN, J.; **Soluble human leukocyte antigen-G and pregnancy success.** *Reprod Biomed Online*, vol. 17, pp. 470-501, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE I

MATERIAL E MÉTODOS

1. DELINEAMENTO

Estudo clínico primário, observacional, com caráter transversal e comparativo.

2. AMOSTRA

A amostragem constituiu-se de 19 casais (n = 38) euro-brasileiros submetidos a TRA devido a impedimento de concepção natural, sendo excluído deste grupo casais com relato de endometriose, idade materna superior a 35 anos, sem diminuição da função ovariana, volume ovariano menor que 3cm³, azoospermia obstrutiva, mulheres que não responderam de forma esperada ao tratamento com estimulação de menos que 12 folículos antrais ou 3 óvulos, e níveis hormonais de FSH e Estradiol superior a 10 e a 80, respectivamente. Níveis considerados mínimos pela Associação Norte-Americana de Reprodução para assegurar que o insucesso reprodutivo não seja devido a baixa resposta ao tratamento. Os casais foram recrutados nas Clínicas de Reprodução Assistida da Cidade de Curitiba, no estado do Paraná, sul do Brasil, principalmente pela clínica “Conceber - Centro de Medicina Reprodutiva”, entre outubro de 2009 a outubro de 2010.

O grupo controle foi composto por 94 casais (n = 188) voluntários, sem parentesco, que apresentaram duas ou mais gestações a termo, sem registro de abortamento de causa desconhecida ou submissão a técnicas artificiais para reprodução. As amostras de sangue periférico foram coletadas e estocadas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade - LIGH desde 1997. Sendo pareados com o grupo paciente de acordo com etnia e classe sócio-econômica.

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) (Apêndice II). Os voluntários de ambos os grupos assinaram termo livre-esclarecido de consentimento e responderam a um questionário de saúde pessoal e ocupacional (Apêndice III).

3. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O processamento e análise das amostras foram realizados no LIGH, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná – BR.

3.1. Extração

A extração do DNA genômico nas amostras de ambos os grupos foram realizadas pela técnica de *salting out*, descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). Posteriormente, realizou-se leitura de densidade óptica e verificou-se pureza, para diluir as amostras para uma concentração de uso de 50 ng/μl de DNA, o armazenamento das amostras foi realizado a -20°C.

3.2. Genotipagem

Após confirmação da pureza e concentração de cada amostra de DNA foi realizada a PCR contendo um volume final de 50μL, composto por tampão *Taq* 10X, 0,45 pmol de cada dNTP (*Invitrogen*), 2 mM de MgCl, 2U *Taq* (*Invitrogen*), 20 pmol de cada primer específico para cada um dos fragmentos e 50 ng de DNA.

Devida a extensão da região 5'URR (1500 pb) optou-se por realizar a amplificação em dois fragmentos, através do uso de 2 pares de *primers* (*Foward 1*: ACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATG, *Reverse 1*: GTGTGCC TTTGAATCCCGATGC, *Foward 2*: CTGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGC e *Reverse 2*: TGTGACTCTGTCTTGCAACCG) com temperaturas de anelamento de 66°C e tamanho dos fragmentos 638pb e 637pb, respectivamente (descrito por SILVA, 2009). A PCR seguiu as condições de uma denaturação inicial a 96°C por 5', 35ciclos de 96° por 1', 66°C por 1' e 72°C por 1' e um anelamento final de 72°C por 5'. A confirmação da amplificação foi visualizada em gel de agarose 1% (Figura 1). Após a amplificação o produto foi purificado com as enzimas Exonuclease I (EXO I) (10U) e SAP (1U) (USB Corporation, Staufen,

Germany) e produto de PCR (concentração maior que 60 ng), volume final de 14 µL, 37°C por 60' e 80°C por 15'. A reação de sequenciamento foi realizada com o *kit Big Dye v.3.1* da *ABI PRISM®* (Applied Biosystems, CA, USA), 35 ciclos de 96°C por 15'', 54°C por 15'' e 60° por 4' e um anelamento final de 72°C por 5'. O produto de amplificação foi purificado com etanol e a análise ocorreu no sequenciador *ABI3130* (Applied Biosystems, CA, USA), eletroferograma analisado pelo programa *SeqAnalyses* (Applied Biosystems, CA, USA) (Figura 2).

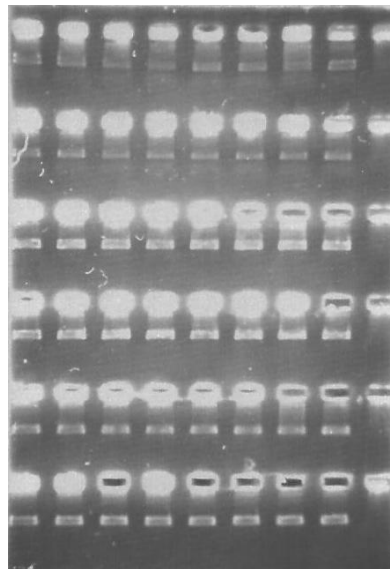


Figura 1: Gel de agarose 1% para checagem da PCR.

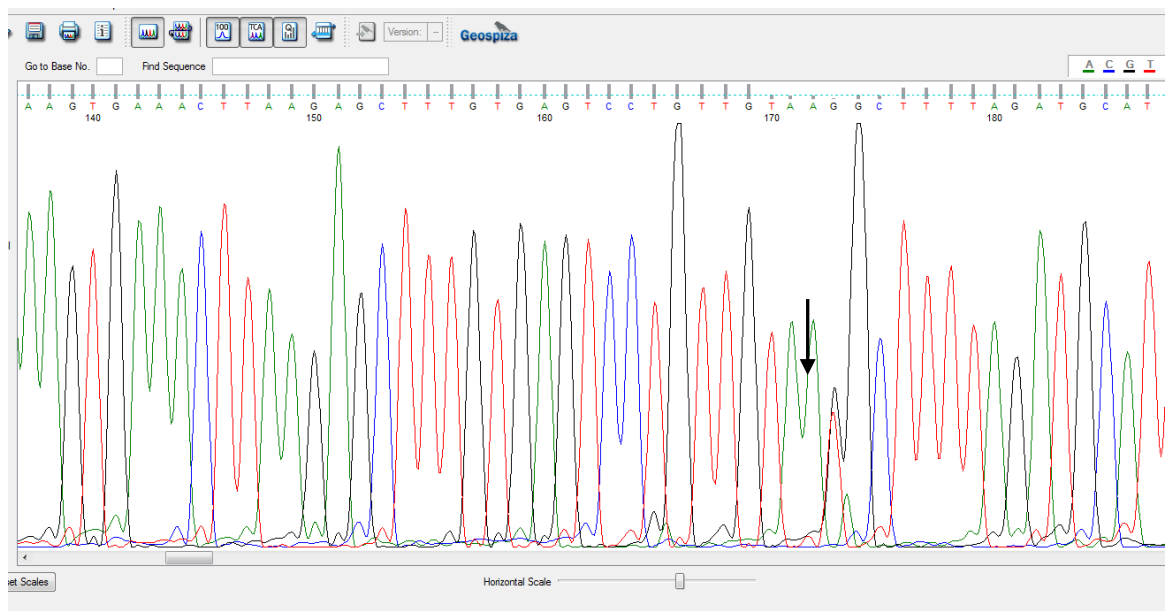


Figura 2: Parte de um eletroferograma, mostrando um indivíduo heterozigoto.

A região 3'UTR, na qual esta inserida a ins/del14pb, foi amplificada utilizando um par de *primers* (*Foward*: GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC e *Reverse*:

GGAAGGAATGCAG TTCAGCATGA) com temperatura de anelamento de 64°C. O tamanho dos fragmentos obtidos para determinar a deleção e a inserção foi 210pb e 224pb, respectivamente (descrito por HVIID *et al*, 2002). Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% (75'/100V), e posteriormente corados com brometo de etídio (Figura 3a), e em gel de poliacrilamida 8% (150'/270V), corado com nitrato de prata (Figura 3b).

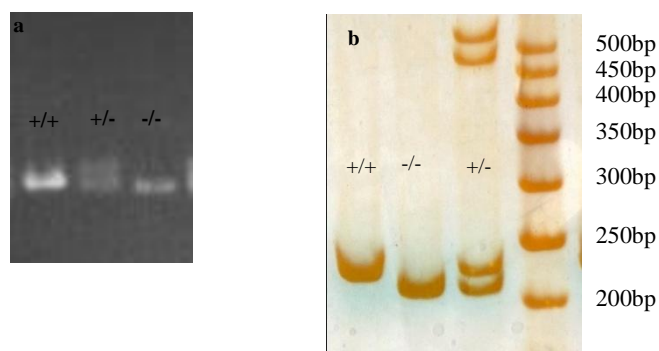


Figura 3: Detecção do polimorfismo ins/del14pb com a) Gel de agarose 2,5% e b) Gel de poliacrilamida 8%. Os genótipos da esquerda para a direita: a) homozigotos +/+14pb, heterozigoto +/-14pb e homozigoto -/-14pb; b) homozigoto -/-14pb, heterozigoto +/-14pb e homozigotos +/+14pb.

3.3. Análise estatística

As análises foram realizadas por comparação pelo programa SeqScape versão 2.5 entre a sequência FASTA disponível na página < <http://www.ensembl.org/index.html>> e a sequência obtida pelo programa SeqAnalyses.

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. A comparação entre amostras (pacientes vs controles; sucesso vs insucesso na TRA) foram realizadas através de tabelas de contingência 3x2 (Teste G) e 2x2 (Teste Exato de Fisher) usando os programas GENEPOP 4.0.10 e BIOESTAT 5.0, respectivamente, sendo representativo de significância $p \leq 0,01$. O OR foi calculado para as comparações estatisticamente significativas, através do BIOESTAT 5.0, com IC 95%.

A estimativa dos haplótipos e suas frequências foram obtidas com o programa ARLEQUIN Versão 3.11 Software, através do algoritmo de maximização da expectativa

(EM), com 1000 repetições (*bootstrap*). O mesmo programa foi utilizado para os valores de desequilíbrio de ligação e a confirmação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A inferência do alelo determinado com as variações genéticas na região codificadora que poderia estar associado com o haplótipo inferido com os resultados obtidos nesse estudo foi realizado com a comparação de dados da literatura, trabalho de Larsen e Hviid, 2009 (Tabela I).

Tabela I: Distribuição dos haplótipos descritos neste estudo comparados com os haplótipos descritos por Larsen and Hviid, 2009

	Haplotype																
	-1306A/G	-1179G/A	-1155G/A	-1140T/A	-1138A/G	-1121C/T	-964A/G	-762T/C	-725C/G/T	-716G/T	-689G/A	-666T/G	-633A/G	-486C/A	-477G/C	-369A/C	
1	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	del
2	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
3	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
4	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins
5	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
6	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del
7	A	G	G	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
8	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	del
9	A	G	G	T	A	C	A	C	C	T	A	G	G	A	C	C	ins
10	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	ins
11	G	A	G	A	A	T	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
12	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	del
13	G	A	G	A	A	C	G	T	C	G	G	T	A	C	G	A	ins
14	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	del
15	G	A	G	A	A	C	G	C	T	T	A	G	G	A	C	C	del
16	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	G	A	del
<i>G*010101a¹</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	Haplótipo 1 e 4
<i>G*010101b</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	
<i>G*010101c</i>	G	A	G	A	A	T	G	C	G	T	A	G	G	A	C	C	Haplótipo 12
<i>G*010101d</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	Haplótipo 1 e 4
<i>G*010101e</i>	G	A	G	A	A	C	G	C	C	T	A	G	G	A	C	C	
<i>G*010102</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		del Haplótipo 11
<i>G*010102</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins
<i>G*010102a²</i>	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	Haplótipo 2 e 3
<i>G*010102b</i>	A	G	G	T	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	
<i>G*010103</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins
<i>G*0103</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins Haplótipo 11
<i>G*0103</i>								T	T	T	A	A	G	A	G		ins
<i>G*0103</i>								C	C	T	A	A	G	A	C		ins
<i>G*0103</i>								C	T	T	A	A	G	A	C		ins
<i>G*0103</i>								C	T	T	A	A	G	A	G		ins
<i>G*010301a</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	
<i>G*010301b</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	
<i>G*010301c</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	
<i>G*010301d</i>	G	G	G	A	G	C	G	C	T	T	A	G	G	A	G	A	
<i>G*010401a</i>	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	Haplótipo 5
<i>G*010401b</i>	A	G	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	C	G	A	
<i>G*0105N</i>								T	C	G	G	T	A	C	G		ins Haplótipo 11

*G*010101a¹*: *G*010101*; *G*010108*; *G*010104*

*G*010102a²*: *G*010102*; *G*010203*; *G*0105N* and *G*010601*;

APÊNDICE II

Curitiba, 02 de agosto de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)(s)
MARIA DA GRAÇA BICALHO DE LACERDA
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):


Comunicamos que o Projeto de pesquisa **"DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELEVANTES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

Protocolo CEP-HC nº 037ext.019/2001-07

O referido projeto foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 31 de julho de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

APÊNDICE III

Laboratório de Imunogenética Humana (LIGH)**Departamento de Genética – UFPR**

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE**CASAL FER –****1 – Identificação do Casal**

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nasc.

Idade

G. Étnico

3 – Profissão

G. Sanguíneo

4 – Fumante () Sim Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)

() Não

5 – Nome do Marido

6 – Data de Nasc.

Idade

G. Étnico

7 – Profissão

G. Sanguíneo

8 – Fumante () Sim Há quanto tempo? (____Anos) (____Meses)

() Não

9 – Endereço:

Nº

Apartamento

Bairro

Cidade

Estado

CEP

Tel. Res.

Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união _____

Idade da mulher ao se casar _____

2 – Consanguinidade: () S () N

Grau de parentesco: _____

3 – Relato de casos de infertilidade ou dificuldade de engravidar na família

() Sim

() Não

Se sim: () família da mulher

() família do homem

4 – Nº total de tratamentos de reprodução anteriores: _____ Abortos _____

6 – Causa da infertilidade _____

7 – Medicação para indução da ovulação _____

8 – Número de óvulos obtidos _____

9 – Número de embriões transferidos _____

Qualidade do embrião _____

10 – Número de embriões vivos _____

11 – Avaliação no 3º dia após a estimulação

Volume ovariano _____

Nº de folículo antral _____

Nível de FSH (Folículo estimulante) _____

Nível de Estradiol _____

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente () Sim () Não

2 – Usa método anticoncepcional? () Sim () Não

Há quanto tempo? _____

Qual? _____

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda? () Sim () Não

Especifique: _____

5 – Enfermidade crônica? () Sim () Não

Qual? _____

6 – Doença auto-imune? () Sim () Não

Qual? _____

7 – Recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Quando? _____

5 – Outros fatores

1 – Fatores femininos

a) Problemas ovulatórios com Clamídias () Sim () Não

b) Cervix incompetente () Sim () Não

c) Síndrome de Asherman () Sim () Não

d) Efeito da fase luteal () Sim () Não

e) Problemas anatômicos () Sim () Não

Quais? _____

2 – Fatores masculinos

a) Prostatite () Sim () Não

3 – Fatores do Casal

a) Infecção por Micoplasma () Sim () Não

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

CONTROLES: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL CONTROLE**CASAL FER –****1 – Identificação do Casal**

1 - Nome da mulher

2 - Data de Nasc.

Idade

G. Étnico

3 – Profissão

G. Sanguíneo

4 – Nome do Marido

5 – Data de Nasc.

Idade

G. Étnico

6 – Profissão

G. Sanguíneo

7 – Endereço:

Nº

Apartamento

Bairro

Cidade

Estado

CEP

Tel. Res.

Tel. Com.

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união

Consangüinidade: ()S ()N

2 – Idade da mulher ao se casar

Grau de parentesco:

3 – Nº total de concepções:

Abortos:

Natimortos:

N. vivos:

4 – Concepções: 1ª 2ª

3ª

4ª

5ª

6ª

5 – Outras uniões ou casamentos:

Consangüinidade: ()S ()N

6 – Data da união:

Nº de concepções:

7 – Idade da mulher ao se casar

8 – Outras uniões ou casamentos:

Consangüinidade: ()S ()N

9 – Data da união:

Nº de concepções:

10 – Idade da mulher ao se casar

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente

2 – Usa método anticoncepcional?

Há quanto tempo? Qual?

3 – Idade da primeira menstruação

4 – Enfermidade aguda?

Especifique:

5 – Enfermidade crônica?

6 – Doença auto-imune?

7 – Recebeu transfusão sanguínea?

Quando?

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar como: () PACIENTE () CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALOENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;
- b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor, bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas e ao sucesso implantacional. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com dois ou mais filhos;
- c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);
- d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;
- e) Não há riscos para você;
- f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para coleta de sangue;
- g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 361-1729 poderá ser contatada no LIGH;
- h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;
- i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;
- j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;
- l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;
- m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;
- n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

Ass. Paciente/Controle _____

Ass. Pesquisador _____

Data ____/____/____